
**Design, Synthese und Pharmakologie neuer
Dopamin-/Serotonin-Rezeptor-Antagonisten und
Cholinesterase-Inhibitoren**

–

Leitstrukturoptimierung und *in vivo*-Experimente

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von
Maria Schulze

geboren am 12. Juli 1982 in Leipzig

1. Gutachter: Prof. Dr. Jochen Lehmann, Jena
2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Fleck, Jena
3. Gutachter: Prof. Dr. Sigurd Elz, Regensburg

Datum der Disputation: 18.06.2010

1	Einleitung	1
1.1	Schizophrenie – Pathophysiologie.....	2
1.1.1	Dopaminhypothese.....	3
1.1.2	Bedeutung von Serotonin	5
1.1.3	Bedeutung weiterer Botenstoffe.....	6
1.2	Neuroleptika und deren Rezeptorbindungsprofile.....	8
1.2.1	typische Neuroleptika	8
1.2.2	atypische Neuroleptika	9
1.3	Cholinesterase-Inhibitoren zur Behandlung der kognitiven Defizite bei Schizophrenie-Patienten.....	11
1.4	<i>In vivo</i> -Untersuchungen mit Neuroleptika	11
1.4.1	Tiermodelle für die Positivsymptomatik.....	11
1.4.2	Tiermodelle für die Negativsymptomatik	14
1.4.3	Tiermodelle für extrapyramidale und motorische Nebenwirkungen	14
1.5	Bisannelierte Hexahydroazecine als potenzielle Neuroleptika	16
1.6	Bivalente Verbindungen	17
1.7	Zielsetzung.....	19
2	Manuskripte.....	22
	Publikation 1	
	Dibenzazecine Scaffold Rebuilding – Is the Flexibility always Essential for High Affinities at Dopamine Receptors?	23
	Publikation 2	
	Ring Expansions of Tetrahydroprotoberberines and Related Dibenzo-[c,g]azecines Modulate the Dopamine Receptor Subtype Affinity and Selectivity	25
	Publikation 3	
	Molecular Combination of the Dopamine and Serotonin Scaffolds Yield in Novel Antipsychotic Drug Candidates – Characterization by <i>in vivo</i> Experiments.....	27
	Publikation 4	
	Bivalent 5,8,9,13b-Tetrahydro-6 <i>H</i> -isoquino[1,2- <i>a</i>]isoquinolines and –isoquinolinium Salts: Novel Heterocyclic Templates for Butyrylcholinesterase Inhibitors	29

Publikation 5	
Exploring the Space Between the Two Pharmacophores: SAR-Studies at Dopamine-Receptors on Dibenz- and Benzindoloazecines with Small Substituents Between the Aromatic Moieties.....	31
3 Bisher unveröffentlichte Ergebnisse.....	33
3.1 Quartäre Ammonium-Verbindungen als Dopamin-Rezeptor-Liganden	33
3.2 Versuche zur Synthese von 3-Methoxy-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo-[d,g]azecin als Edukt für die <i>ad-hoc</i> Synthese eines ¹¹ C-Radioliganden.....	35
3.3 Versuche zur Synthese eines an Dopamin-Rezeptoren agonistisch wirkenden Hexahydrodibenzo[d,g]azecins	38
3.4 Bivalente Hexahydrodibenzo[d,g]azecine	40
3.5 Inhibierung von Cholinesterasen durch bivalente N-verknüpfte Tetrahydrodibenzochinolin-Derivate	41
3.6 Tierversuche mit bivalenten Verbindungen.....	42
4 Gesamtdiskussion	45
4.1 Struktur-Wirkungs-Beziehungen.....	45
4.1.1 Modifikation des Annelierungsmusters	47
4.1.2 Ringerweiterung von Hexahydrodibenzo[c,g]azecinen.....	48
4.1.3 Substitution zwischen den Aromaten	50
4.1.4 Bivalente Verbindungen.....	51
4.1.5 Quartäre Strukturen.....	54
4.2 Zytotoxizitäten	55
4.3 Tierversuche	57
4.3.1 Auswahl der Testsubstanzen.....	57
4.3.2 Stabsprung	58
4.3.3 Lokomotorische Aktivität.....	60
4.3.4 Katalepsie.....	61
4.3.5 Korrelationen	62

5	Zusammenfassung	65
6	Conclusion	68
7	Literaturverzeichnis	70
8	Anhang	78
8.1	Analytische Daten bisher unveröffentlichter Strukturen	78
8.2	Abkürzungsverzeichnis	84
8.3	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	85
8.4	Curriculum vitae	87
8.5	Publikationsverzeichnis	88
8.5.1	Wissenschaftliche Beiträge in Fachzeitschriften	88
8.5.2	Poster	89
8.5.3	Vorträge	89
8.6	Selbstständigkeitserklärung	90
8.7	Danksagung	91

1 Einleitung

Die Schizophrenie gehört zu den endogenen Psychosen mit meist chronischem Verlauf. Bislang ist eine Diagnose dieser Erkrankung nur anhand der sehr vielfältigen Symptome möglich. Als Positivsymptomatik bezeichnet man dabei Symptome, die zu dem normalen Erleben hinzukommen, wie Wahnvorstellungen, akustische Halluzinationen oder Denk- bzw. Sprachstörungen, während der Negativsymptomatik soziale Isolation, Sprachverarmung, Affektverflachung oder Antriebsarmut zugeordnet werden. Zusätzlich treten häufig kognitive und motorische Defizite auf, die oft als eigener Symptomkomplex betrachtet werden (van Os 2009). Eine differenzierte Aufschlüsselung der Symptome in den verschiedenen Unterformen der Schizophrenie findet sich in der *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision* (ICD-10) (WHO 2010).

Während die Positivsymptomatik mit Neuroleptika relativ gut behandelbar ist, sind kognitive und Negativsymptome nur schwer therapierbar. Zudem treten mit den gängigen Antipsychotika häufig nicht tolerierbare Nebenwirkungen auf, die zu einer hohen Abbruchrate der Therapie führen (Masand 2006). Trotz der für Neuroleptika weiterhin anerkannten notwendigen Affinität zu Dopamin D₂-Rezeptoren, sind auch andere Dopamin- aber auch Serotonin-Rezeptoren im Fokus für die Neuentwicklung von Antipsychotika (Toda 2007). Diese sollten insbesondere verbesserte Eigenschaften hinsichtlich Negativsymptomatik und Nebenwirkungsprofil aufweisen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einer Substanzklasse, welche die Grundstrukturen von Dopamin (D) und Serotonin (5-HT) in einem Molekül vereinigt. Es wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt, dass dieser Ansatz zu Hexahydrobenzindolo- bzw. -dibenzo[d,g]azecinen (im Folgenden auch als [d,g]-Azecine bezeichnet) führt, die sowohl an Dopamin-Rezeptoren, als auch an Serotonin-Rezeptoren hohe Affinitäten aufweisen (Hoefgen 2006; Enzensperger 2008).

Eine vollständige Strukturaufklärung mittels Röntgenstrukturanalyse ist bislang nur für wenige membrangebundene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) gelungen, nicht jedoch für die ebenfalls zu dieser Klasse gehörenden Dopamin- und Serotoninrezeptoren (Topiol 2009). Ohne Kristallstrukturen ist es trotz bekannter Aminosäuresequenzen kaum möglich, Aussagen über die genaue Konformationen zu machen. Durch Strukturwirkungsbeziehungen kann ein Beitrag zur Aufklärung der räumlichen Struktur innerhalb der Bindungstasche im Rezeptor geleistet werden. Neue Selektivitätsprofile an Dopamin- und Serotonin-Rezeptoren bieten außerdem die Möglichkeit, Erkenntnisse über die Bedeutung der einzelnen Rezeptor-Subtypen zu erlangen. Dies ist vor allem durch Korrelationen von *in vitro* ermittelten Affinitätsdaten und Ergebnissen von *in vivo* Versuchen möglich.

Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die Pathophysiologie der Schizophrenie und die Bedeutung der einzelnen Neurotransmittersysteme gegeben, sowie gängige Neuroleptika mit ihren Vor- und Nachteilen vorgestellt werden. Desweiteren werden die Möglichkeiten von *in vivo* Versuchen bei der Erforschung von Antipsychotika kurz beleuchtet und bisherige Erkenntnisse über die in dieser Arbeit untersuchte Substanzklasse der [d,g]-Azecine zusammengefasst.

1.1 Schizophrenie – Pathophysiologie

Die Pathoätiologie der Schizophrenie ist immer noch nicht vollständig aufgeklärt. Dennoch geht man von einer multifaktoriellen Genese aus, in welcher genetische Faktoren, pathologische Veränderungen im Gehirn, aber auch psychosoziale Belastungsfaktoren eine Rolle spielen (*Vulnerabilitäts-Stress-Modell* (Zubin 1977; Thompson 2007)).

Die Beteiligung von **genetischen Faktoren** wurde in Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien vielfach belegt und etliche Gene identifiziert, die an der Ätiologie beteiligt sein könnten. Allerdings sind erbliche Faktoren nicht ausschließlich für die Krankheit verantwortlich, wie Studien an eineiige Zwillingen belegen, die nur zu 40-60% gleichermaßen von der Krankheit betroffen sind (Kendler 1993; Maier 1999).

Wie mittels Computer-Tomographie, Magnet-Resonanz-Tomographie, Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und Single Photo Emissions Computer Tomographie gezeigt werden konnte, **verändern** sich im Verlauf der Erkrankung einige **Teile des Gehirns**. Häufig sind die (v.a. lateralen) Ventrikel erweitert oder Teile des Hippocampus (temporaler und frontaler Cortex) verkleinert (Henn 1999; McCarley 1999; Dickey 2002). Hirnasymmetrie und Konnektivität verschiedener Hirnregionen weisen ebenfalls zum Teil deutliche Auffälligkeiten auf (Pearlson 1999; Whalley 2009). Zudem ergaben PET-Studien einen verringerten zerebralen Blutfluss im frontalen Cortex, die sogenannte „Hypofrontalität“ (Buchsbaum 1982).

Weinberger (1987) stellte die Hypothese auf, dass **neuronale Entwicklungsstörungen** die Ursache einer Schizophrenie darstellen. Gestützt durch Befunde von strukturellen Hirnveränderungen beim Ausbruch der Krankheit (Turner 1986), geht diese These davon aus, dass eine Schädigung des Gehirns während der Embryonalentwicklung erst später – nach der normalen Hirnentwicklung und vermutlich ausgelöst durch einen externen Reiz – zum Ausbruch einer Erkrankung führt.

Die meisten Befunde weisen auf eine **veränderte Neurotransmitterfunktion** im Gehirn hin. Besonders beteiligt scheinen hierbei Dopamin und Serotonin, aber möglicherweise auch andere Botenstoffe, wie Glutamat zu sein. In zahlreichen Experimenten, insbesondere mit PET-Studien,

wurde das Vorkommen von Dopamin- und Serotonin-Rezeptoren in verschiedenen Hirnarealen untersucht und Veränderungen zum gesunden Gehirn festgestellt (Lanzenberger 2005; Meisenzahl 2007). Über die genaue Bedeutung dieser Neurotransmitter gibt es eine Vielzahl von Theorien: Eine Hypothese zur Entstehung der Positivsymptomatik besagt, dass durch eine vermehrte dopaminerge Transmission Wahrnehmungen eine zu starke Bedeutsamkeit beigemessen wird (Kapur 2003), während andere davon ausgehen, dass durch die Enthemmung thalamischer Kerngebiete eine Reizüberflutung des Cortex zu den typischen Symptomen der Schizophrenie führt (Carlsson 2006). Im Folgenden soll auf die Bedeutung der einzelnen Neurotransmitter in der Pathophysiologie der Schizophrenie eingegangen werden.

1.1.1 Dopaminhypothese

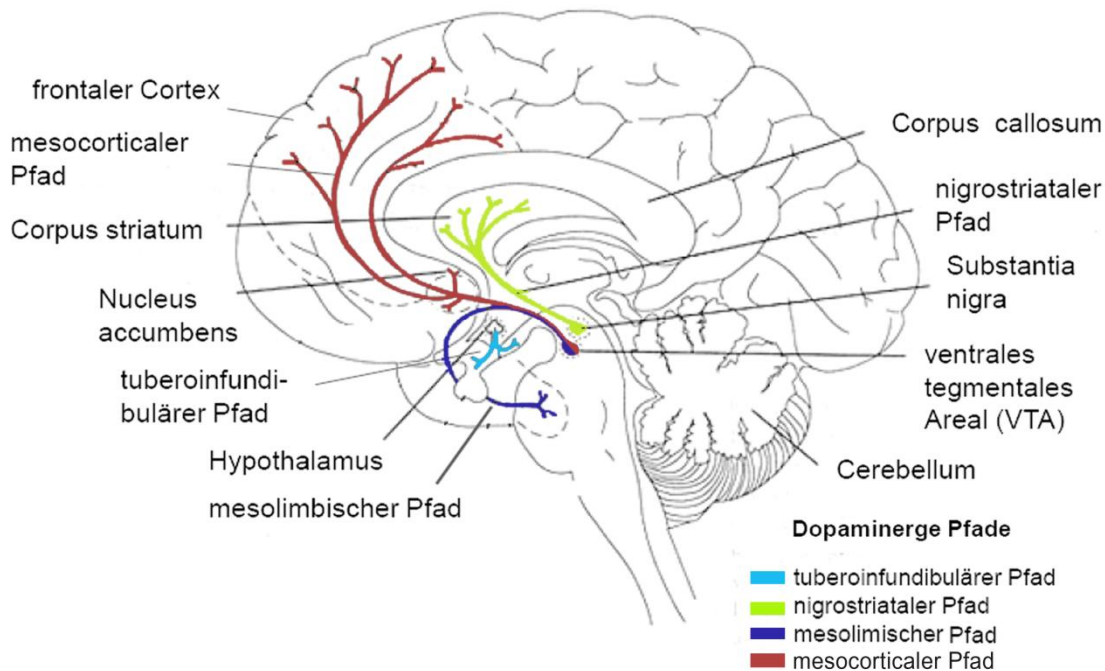
Dopamin-Rezeptoren sind an vielen neurologischen Prozessen beteiligt. Unter anderem werden über D₁-D₅-Rezeptoren Motivation, Genuss, Gedächtnis und Lernvorgänge, sowie zielgerichtete Handlungs- und Bewegungsabläufe und die Modulation neuroendokriner Signalwege gesteuert (Girault 2004).

Bereits 1966 postulierte *van Rossum*, dass Schizophrenie durch die Überaktivität bestimmter dopaminergere Bereiche des Gehirns verursacht sein könnte (van Rossum 1966). *Snyder* (1976) begründete diese Annahme und entwickelte die *Dopaminhypothese der Schizophrenie*, die davon ausgeht, dass eine Dopaminüberfunktion die Ursache der Krankheit darstellt und demnach Schizophrenie mit Dopamin-Antagonisten behandelt werden kann. Diese Annahme basierte auf der Erkenntnis, dass Dopamin-Antagonisten die positiven Symptome von Schizophrenie mildern und eine Amphetamingabe, die zum Anstieg des Dopaminlevels in den Synapsen führt, Psychosen auslösen kann. Damals wurde noch nicht beachtet, dass Dopamin nicht in allen Hirnregionen die gleichen Aufgaben erfüllt.

So werden die dopaminergen Projektionen im Gehirn von Säugern in verschiedene Pfade unterteilt, von denen die vier wichtigsten in Abbildung 1.1.1 schematisch dargestellt sind. Das **mesocorticale System** verbindet das ventrale tegmentale Areal (VTA) mit dem Cortex, insbesondere dem präfrontalen Cortex (PFC), und ist an Motivation sowie kognitiven und emotionalen Funktionen beteiligt. Das **mesolimbische System** projiziert vom VTA zum ventralen Striatum und den Basalganglien und scheint für Belohnungs- und Lustempfinden verantwortlich zu sein. Meist werden diese beiden Pfade zum **corticolimbischen System** zusammengefasst. Das **nigrostriatale System** verbindet die Substantia nigra mit dem Corpus striatum und reguliert die Extrapyramidalmotorik. Ein Untergang dopaminergere Neurone in diesem Bereich wie bei Morbus Parkinson, aber auch eine Blockade der lokalen Dopamin-Rezeptoren führt häufig zu Bewegungsstörungen, den extrapyramidalen Symptomen (EPS). Das **tuberoinfundibuläre System** projiziert zwischen dem Hypothalamus und der Hypophyse, von wo aus die Prolaktinfreisetzung gesteuert

wird. Eine Blockade der dort vorhandenen D_2 -Rezeptoren führt zu einem erhöhten Prolaktinspiegel, der vielfältige Nebenwirkungen klassischer Neuroleptika hervorruft.

Abbildung 1.1.1 Dopaminerge Pfade im menschlichen Gehirn modifiziert nach Crocker (1994)



Die Dopaminhypothese wurde 1991 durch *Davis et al.* dahingehend modifiziert, dass nur im mesolimbischen Dopaminsystem eine Überfunktion vorherrscht die für die Positivsymptomatik entscheidend ist, während es im mesocorticalen System im Bereich des PFC zu einer Dopaminunterfunktion kommt, die die Negativsymptome verursacht (Davis 1991). In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Dopaminunterfunktion im PFC die striatale Dopaminüberfunktion bedingt und damit ein direkter Zusammenhang zwischen Über- und Unterfunktion besteht (Scatton 1982). Zudem wurde die vorher postulierte, alleinige Bedeutung des Dopamin D_2 -Rezeptor-Subtyps angezweifelt, da Clozapin, trotz vergleichsweise geringer D_2 -Affinität, gute Wirkungen am Patienten zeigte (Meltzer 1989a). Daher wurde auch der Einfluss von D_3 -, D_4 - und D_5 -Rezeptoren insbesondere auf die Negativsymptomatik und die kognitiven Fähigkeiten bei Schizophrenie postuliert, was bisher jedoch nicht eindeutig belegt werden konnte (Hersi 2000; Pugsley 2002; Micheli 2006).

Es konnte nachgewiesen werden, dass bei Schizophreniepatienten eine gesteigerte Synthese und Freisetzung von Dopamin, sowie eine erhöhte Besetzung von D_2 -Rezeptoren im Gehirn vorliegt (Abi-Dargham 1998, 2000; Lindstrom 1999). Die derzeitige Befundlage spricht dafür, dass eine Dopaminüberaktivität an D_2 -Rezeptoren im Striatum für die Positivsymptomatik verantwortlich ist. Die Bedeutung des Dopaminsystems für die Schizophrenie bleibt damit unbestritten (Abi-Dargham 2004; Howes 2009). Gegenstand der heutigen Forschung ist es allerdings, auch Anomalitäten anderer Neurotransmittersysteme im Verlauf der Schizophrenie zu berücksichtigen und in die *Dopaminhypothese* mit einzubeziehen (Toda 2007).

1.1.2 Bedeutung von Serotonin

Im gesunden Gehirn reguliert Serotonin neben vielen anderen Funktionen über 5-HT_{1A/B}-Rezeptoren aggressives Verhalten und wirkt über 5-HT_{2A}-Rezeptoren stimmungsmulierend. Lysergsäurediethylamid (LSD, Abbildung 1.1.2), ein 5-HT_{2A}-Agonist, kann sogar Psychosen auslösen (Vollenweider 1998). Während die klassischen Neuroleptika hauptsächlich an Dopamin-Rezeptoren binden, zeigte Clozapin, ein hochpotentes Neuroleptikum mit guter Wirkung auf die Negativsymptomatik, hohe Affinitäten zu Serotonin-Rezeptoren. Dies führte schließlich zu der These, dass Serotonin, insbesondere über 5-HT_{1A}-, 5-HT_{2A}-, 5-HT_{2C}-, 5-HT₆- und 5-HT₇-Rezeptoren neben Dopamin ebenfalls eine entscheidende Rolle bei Schizophrenie spielen könnte (Altar 1986). Vor allem die höhere Affinität zu 5-HT_{2A}-Rezeptoren im Vergleich zur D₂-Rezeptor-Affinität wurde als Kriterium für die „atypischen“ Eigenschaften von Clozapin postuliert (Meltzer 1991). Eine Kombination von 5-HT_{2A}-Rezeptor-Antagonisten mit geringen Dosen von D₂-Rezeptor-Antagonisten wie Haloperidol führt zu einer vermehrten Dopaminausschüttung im PFC, während selektive 5-HT_{2A}-Rezeptor-Antagonisten allein, ebenso wie der 5-HT_{2A/2B/2C}-Rezeptor-Antagonist Ritanserin (Abbildung 1.1.2), keine Effekte auf die Dopaminausschüttung in verschiedenen Hirnarealen zeigen (Andersson 1995). Durch die Abschwächung der Hypoaktivität an dopaminergen Rezeptoren im PFC kann damit erklärt werden, warum D₂/5-HT_{2A}-Antagonisten bessere Eigenschaften gegenüber der Negativsymptomatik aufweisen als Dopamin-Antagonisten ohne oder mit geringerer Serotonin-Rezeptor-Affinität (Meltzer 2003). Ebenso zeigten sich durch eine zusätzliche 5-HT_{2A}-Rezeptor-Blockade positive Effekte auf die antipsychotische Wirksamkeit (Wadenberg 2001).

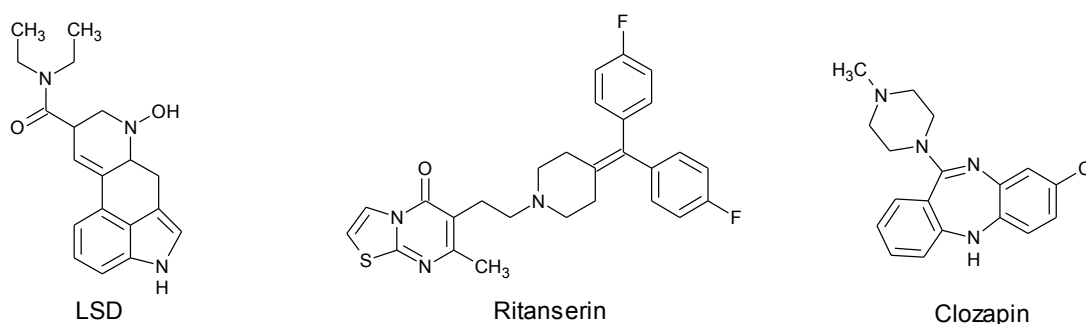


Abbildung 1.1.2 Beispiele einiger Serotonin-Rezeptor-Liganden

Bislang ist nicht genau bekannt, welchen Einfluss die 5-HT_{2A}-Blockade auf die verschiedenen Neurotransmittersysteme im Gehirn hat. Neben einer Beeinflussung der Glutamatfreisetzung (Davies 1987) scheint auch ein enger Zusammenhang mit 5-HT_{1A}-Rezeptoren zu bestehen, über deren Aktivierung die Dopamin- und Acetylcholinspiegel im PFC angehoben werden können. 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten zeigen, ähnlich den 5-HT_{2A}-Rezeptor-Antagonisten, positive Auswirkungen auf EPS, sowie Negativ- und Positivsymptomatik, wenn sie zusammen mit Dopamin-Antagonisten verabreicht werden (Wadenberg 1991; Jones 2008). *Ichikawa et al.* (2001) postulierten, dass die 5-HT_{2A}-Rezeptor-Blockade zu einer Aktivierung der 5-HT_{1A}-Rezeptoren führt, was in einer vermehrten Dopaminausschüttung im PFC resultiert. Diese These basierte auf

elektrophysiologischen Untersuchungen mit selektiven Liganden und dem Befund, dass selektive 5-HT_{1A}-Rezeptor-Antagonisten sowohl die positiven Effekte von 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten als auch von 5-HT_{2A}-Rezeptor-Antagonisten aufheben können.

Die Bedeutung der 5-HT_{2C}-Rezeptoren für die Pathophysiologie der Schizophrenie ist bislang völlig ungeklärt. Es ist bekannt, dass über diese Rezeptoren die Dopaminausschüttung im mesolimbischen und nigrostriatalen Pfad reguliert werden kann (Alex 2007). Im ventralen Tegmentum inhibiert eine Aktivierung dieser Rezeptoren die Dopaminfreisetzung im mesocorticalen System (Millan 1998). Dadurch wären Agonisten am 5-HT_{2C}-Rezeptor in der Lage, die Dopaminausschüttung im mesolimbischen System zu verringern und folglich die Positivsymptomatik zu reduzieren. Sie würden aber ebenso durch ihre Wirkung im mesocorticalen System die Negativsymptomatik verstärken und die Kognition verschlechtern, sowie im striatalen Bereich EPS verursachen. Antagonisten würden sich hingegen vermutlich negativ auf die Positivsymptomatik auswirken (Kim 2009). Interessanterweise verringern 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2C}-Rezeptor-Antagonisten gegenseitig ihre Wirkungen auf die Dopaminfreisetzung, so dass für den 5-HT_{2A/2C}-Rezeptor-Antagonisten Ritanserin keine vermehrte Dopaminausschüttung im mesolimbischen System beobachtet wurde (Ichikawa 1999). Diese Überlegungen wurden durch eine negative Korrelation der 5-HT_{2C}-Rezeptor-Affinität klassischer Antipsychotika zur klinisch wirksamen Dosis bestätigt, die nicht für atypische Neuroleptika mit 5-HT_{2A}-Rezeptor-Affinität zutrifft (Richtand 2008).

Da 5-HT_{6/7}-Rezeptoren noch relativ wenig erforscht sind, gibt es nur sehr vage Vermutungen über deren Bedeutung für die Schizophrenie. Selektive 5-HT₆-Rezeptor-Antagonisten führen zu einer vermehrten Freisetzung von Glutamat und möglicherweise von Acetylcholin im PFC und Hippocampus (Meltzer 2003). Es wird vermutet, dass Neuroleptika mit hohen Affinitäten zu diesen Rezeptoren möglicherweise einen positiven Einfluss auf kognitive Symptome zeigen. 5-HT₇-Rezeptoren scheinen die Acetylcholinausschüttung nicht zu beeinflussen. Man schreibt ihnen aber eine Wirkung gegen Depressionen zu, die vor allem die Negativsymptomatik betreffen (Kim 2009).

1.1.3 Bedeutung weiterer Botenstoffe

Neben Dopamin und Serotonin wird auch der Einfluss vieler anderer Neurotransmitter bei Schizophrenie diskutiert. Die wesentlichsten Hypothesen und die daraus resultierenden Therapieansätze werden nachfolgend vorgestellt.

Die Hypothese einer Beteiligung von **NMDA-Rezeptoren** in der Ätiologie der Schizophrenie beruht hauptsächlich auf der Beobachtung, dass NMDA-Rezeptor-Antagonisten schizophrene Psychosen auslösen können, während NMDA-Rezeptor-Agonisten, wie Glycin oder D-Serin in Kombination mit typischen Neuroleptika die Symptome einer Schizophrenie beseitigen können (Gaspar 2009).

Die *Glutamathypothese* geht von einer Hypofunktion von Glutamat in der corticostriatalen Projektion aus, was einen gesteigerten sensorischen Input, ein verringertes Signal-Rausch-Verhältnis und einen erhöhten dopaminergen Einstrom im VTA hervorruft (Lang 2007). Allerdings wird vermutet, dass die dopaminerge Dysfunktion nur sekundär durch eine Glutamat-Dysfunktion hervorgerufen wird (Lisman 2008).

GABA_A-Rezeptoren scheinen vor allem für die kognitiven Symptome der Schizophrenie eine Rolle zu spielen. In *post mortem*-Untersuchungen wurde festgestellt, dass die corticalen GABA_A-Rezeptoren bei Schizophrenie-Patienten deutlich reduziert waren (Perry 1979). Besonders in Experimenten in denen das Arbeitsgedächtnis als Bestandteil der kognitiven Fähigkeiten untersucht wurde, scheint die GABA_A-Aktivität im PFC von Bedeutung zu sein (Charych 2009).

Ebenso wird postuliert, dass **nikotinerge** und **muskarinerge Rezeptoren**, insbesondere durch Interaktionen zwischen cholinergem und glutaminergem System, eine Rolle spielen könnten. Das Rauchen ist unter Schizophrenie-Patienten signifikant mehr verbreitet als in der Gesamtbevölkerung (80-90% der Erkrankten rauchen). Es wird angenommen, dass Nikotin den Patienten als eine Art „Selbsttherapie“ dient, da dadurch zum einen EPS gemildert und zum anderen das Filtern externer Reize („*sensory gating*“) vorrübergehend gebessert werden kann (Adler 1993; Uneri 2006). Auch Agonisten an den muskarinischen Rezeptoren M₁ und M₄ zeigten in Tierstudien positive Effekte auf die Symptome (Hughes 1986; Tizabi 2007). Zudem wurde in *post mortem*-Studien an Schizophrenie-Patienten eine verringerte Dichte cholinergischer Rezeptoren in Striatum, Thalamus und Cortex nachgewiesen (Breese 2000). Der selektive α₇-Agonist 3-(2,4-Dimethoxybenzyliden)-anabasein (DMXBA, Abbildung 1.1.3) wird bereits an Schizophrenie- und Alzheimer-Patienten untersucht, nachdem er in Tierexperimenten deutliche Verbesserungen in den Bereichen Lernen, Gedächtnis und „*sensory gating*“ erbracht hat (Freedman 2008).

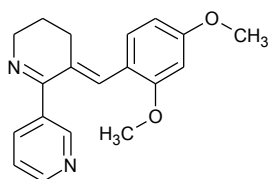


Abbildung 1.1.3 Selektiver α₇-Agonist 3-(2,4-Dimethoxybenzyliden)-anabasein

1.2 Neuroleptika und deren Rezeptorbindungsprofile

1.2.1 typische Neuroleptika

Seit den 1950er Jahren werden trizyklische Neuroleptika mit Thioxanthen- (zum Beispiel Chlorprothixen, Flupentixol) oder Phenothiazingrundgerüst (zum Beispiel Chlorpromazin, Levomepromazin) bei Schizophrenie eingesetzt (Abbildung 1.2.1). *Janssen* entdeckte 1958 bei der Entwicklung neuer Analgetika zufällig die neuroleptische Potenz von Haloperidol, einem Butyrophenon, welches weitreichende Bedeutung erlangen sollte. Aus dieser Entdeckung entwickelte sich eine gesamte Substanzklasse, einschließlich Fluspirilen oder Pimozid (Bangen 1992).

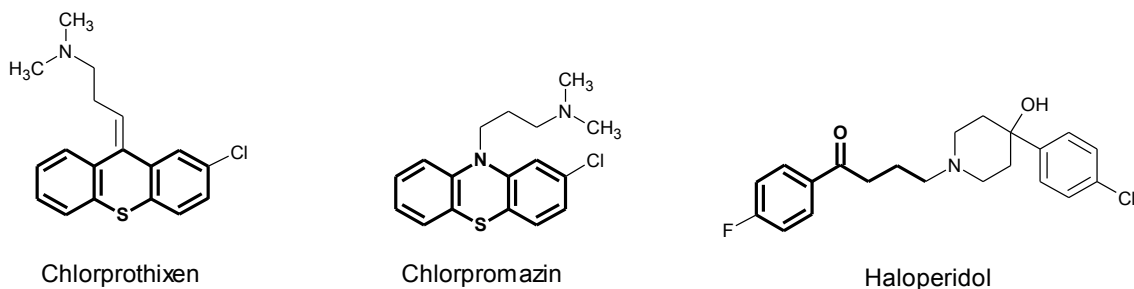


Abbildung 1.2.1 Beispiele klassischer Neuroleptika und deren Grundgerüste

Die Wirkung von typischen Neuroleptika beruht hauptsächlich auf einer Blockade der D_2 -Rezeptoren, obwohl viele dieser Substanzen auch an anderen Rezeptoren binden. Die Potenz eines typischen Neuroleptikums korreliert direkt mit der D_2 -Rezeptor-Affinität (Creese 1976; Seeman 1976), wobei die antipsychotische Wirkung bei einer Rezeptorbesetzung von 60-70% einsetzt (Heinz 1996). Durch ihre hauptsächlich auf den Dopamin-Rezeptor beschränkte antagonistische Wirkung verbessern sie vorrangig die Positivsymptomatik der Schizophrenie und zeigen kaum Vorteile bei der Negativsymptomatik oder kognitiven Fähigkeiten. Zudem verursachen sie durch Blockade der extrapyramidal-motorischen D_2 -Rezeptoren im Mittelhirn häufig motorische Nebenwirkungen, wie EPS oder tardive Dyskinesien. Diese Parkinson-ähnlichen Symptome treten bei 75% der mit typischen Neuroleptika behandelten Patienten auf und führen zu einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität (Casey 1991). Hyperprolaktinämie, eine weitere häufige Nebenwirkung typischer Neuroleptika, wird ebenfalls durch D_2 -Rezeptor-Blockade hervorgerufen. Durch den Dopamin-Antagonismus im tuberoinfundibulären System wird die hemmende Wirkung von Dopamin auf die Prolaktinfreisetzung im Hypothalamus verhindert. Als Folge dessen werden die Spiegel der Geschlechtshormone verringert, was Auswirkungen auf sexuelle Funktionen, Fruchtbarkeit, Menstruation, Brustwachstum beim Mann oder Hirsutismus bei Frauen aber auch auf die Knochendichte hat (Haddad 2007). Falls der Patient selbst konventionelle Antipsychotika präferiert oder diese bereits ohne relevante Nebenwirkungen regelmäßig einnimmt, wird trotz dieser Nebenwirkungen der Einsatz von klassischen Neuroleptika, vor allem von Haloperidol, Fluphenazin, Flupentixol oder Perazin empfohlen (Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie 2006).

1.2.2 atypische Neuroleptika

Die Entdeckung von Clozapin 1958 stellte die *Dopaminhypothese* in ihrer ursprünglichen Version vollkommen in Frage. Dieses erste atypische Neuroleptikum war effektiv gegen Positivsymptome, verursachte aber keinerlei EPS und erhöhte auch nicht den Prolaktinspiegel. Zudem wirkte es ebenfalls gegen Negativsymptome und verbesserte die Kognition (Kane 1988). Statt der vorher als essentiell postulierten hohen D_2 -Rezeptor-Affinität, zeigte Clozapin vor allem an D_4 - und $5-HT_{2A}$ -Rezeptoren antagonistische Eigenschaften (Meltzer 1989a). Im Folgenden wurden zahlreiche weitere Antipsychotika entwickelt, die alle eine höhere Affinität zu $5-HT_{2A}$ -Rezeptoren als zu D_2 -Rezeptoren aufwiesen, unter anderem Quetiapin, Olanzapin, Risperidon, Ziprasidon und Sertindol. Ihnen ist gemeinsam, dass sie gegen positive und negative Symptome der Schizophrenie wirksam sind und signifikant weniger extrapyramidale Nebenwirkungen verursachen als die klassischen Neuroleptika (Meltzer 1991). Später wurden auch Antipsychotika mit anderen Rezeptor-Bindungsprofilen den atypischen Neuroleptika zugeordnet (vgl. Abbildung 1.2.2). Aripiprazol ist ein partieller D_2 -Rezeptor-Agonist und bindet weniger stark an $5-HT_{2A}$ -Rezeptoren. Die Benzamide Amisulpirid, Sulpirid oder Remoxiprid wirken hingegen als selektive D_2/D_3 -Antagonisten mit generell nur sehr schwachen Affinitäten zu anderen Rezeptoren (Burris 2002; Pani 2002). Auf Grundlage der Definition von atypischen Neuroleptika als Substanzen, die wirksam sind gegen Positivsymptome der Schizophrenie und wenig EPS verursachen, wurden auch selektive D_3 - oder D_4 -Antagonisten, M_1 - oder M_4 -Agonisten sowie selektive $5-HT_{2A}$ - oder $5-HT_{2A/C}$ -Antagonisten dieser Klasse zugeordnet. Ihre antipsychotische Wirksamkeit ist klinisch jedoch noch nicht hinreichend belegt (Meltzer 2004).

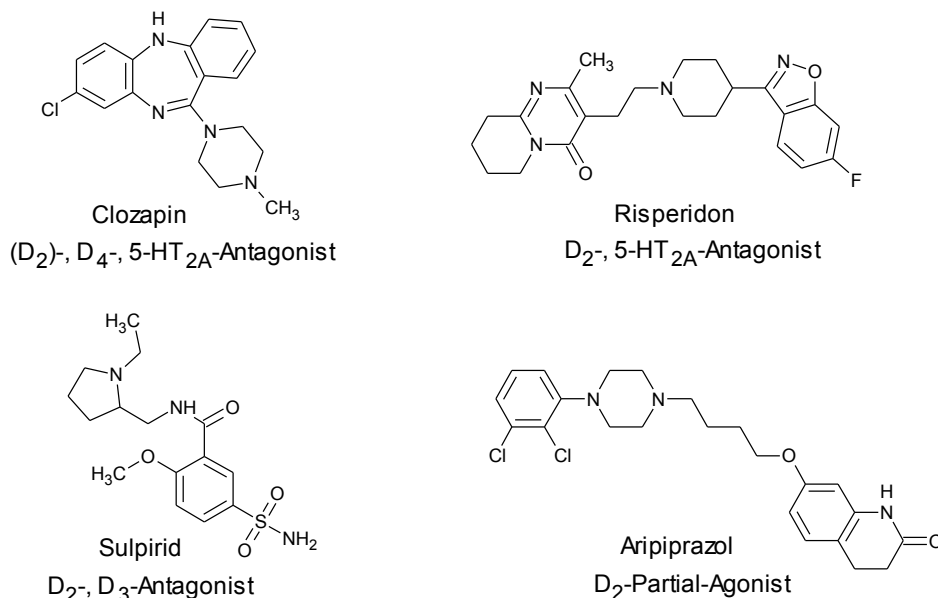


Abbildung 1.2.2 Beispiele atypischer Neuroleptika

Dem Attribut „atypisch“ wurden verschiedene Eigenschaften der Neuroleptika zugrunde gelegt. Vornehmlich werden Wirkungen, die denen des Clozapin ähneln, als „atypisch“ angesehen. Neben

verringerten extrapyramidalen Nebenwirkungen wird die Verbesserung negativer und kognitiver Symptome, ebenso wie die Wirkung bei Therapieresistenz als Kriterium betrachtet.

Für die Erklärung der „atypischen“ Eigenschaften gibt es verschiedene Modelle. *Meltzer et al.* entwickelte 1989 die *Dopamin-Serotonin-Hypothese*, in welcher er eine höhere Affinität zu 5-HT_{2A}- als zu D₂-Rezeptoren für die Eigenschaften von „atypischen“ Neuroleptika verantwortlich machte (Meltzer 1989b). Zwar korreliert die striatale D₂-Rezeptor-Blockade stark mit der Wirksamkeit gegenüber der Positivsymptomatik, nicht jedoch mit den Effekten auf die Negativsymptome, wie in einer Studie mit Risperidon und Olanzapin gezeigt werden konnte (Agid 2007). Die D₂-Blockade sollte hierbei unter dem Schwellenwert für das Auftreten der EPS bleiben, während die Bindung am 5-HT_{2A}-Rezeptor zu positiven Modulationen in anderen Neurotransmittersystemen führen würde (Meltzer 2003). Hingegen geht die von *Kapur et al.* (2001) entwickelte *Fast-off-Hypothese* davon aus, dass atypische Antipsychotika weniger fest an D₂-Rezeptoren binden und dadurch schneller sich von diesen lösen können. Dies könnte auch Befunde erklären, in denen Clozapin *in vivo* wesentlich geringere D₂-Rezeptor-Besetzung bei wirksamen Dosen aufweist (40-60%) als typische Neuroleptika (70-90%) (Farde 1992; Nordstrom 1992). Allerdings trifft die *Fast-off*-Beobachtung nur für Clozapin und Quetiapin zu, nicht jedoch für Risperidon oder Olanzapin (Meltzer 2004). Als weitere Möglichkeit wird diskutiert, dass atypische Neuroleptika bevorzugt D₂-Autorezeptoren blockieren oder eine verstärkte Induktion von neuronaler Plastizität und synaptischem Remodeling auslösen könnten (Horacek 2006).

Atypische Neuroleptika besitzen nicht ausschließlich Vorteile gegenüber klassischen Neuroleptika. Sowohl metabolische Probleme, wie Übergewicht oder erhöhte Blutzucker- bzw. Triglyceridwerte, als auch kardiovaskuläre Nebenwirkungen treten wesentlich häufiger bei atypischen Neuroleptika auf (Haddad 2007). Zu den schwerwiegendsten Nebenwirkungen von Clozapin zählt die Agranulozytose, die bei ein bis zwei Prozent der mit Clozapin behandelten Patienten vorkommt. Sie ist eine schwere Form der Neutropenie, bei welcher die Abwehrfunktion des Körpers dramatisch verringert wird. Eine engmaschige Blutbildkontrolle ist bei Clozapingabe daher unabdingbar (Alvir 1993).

1.3 Cholinesterase-Inhibitoren zur Behandlung der kognitiven Defizite bei Schizophrenie-Patienten

Da bei ca. 85% der Schizophrenie-Patienten kognitive Einschränkungen vorliegen (Heinrichs 1998), es aber bisher nur unzureichende Therapiemöglichkeiten dieser Symptome gibt, besteht auf diesem Gebiet dringender Forschungsbedarf (Hill 2010). Cholinesterase-Inhibitoren, wie Donepezil, Rivastigmin oder Galantamin (Abbildung 1.3.1) werden bislang vorrangig bei der Therapie der Alzheimer-Demenz eingesetzt und zeigen dort signifikante Verbesserungen der kognitiven Fähigkeiten. Die Anhebung der Konzentration cholinergischer Neurotransmitter mittels Cholinesterase-Inhibitoren wird seit einigen Jahren auch bei Schizophrenie als Therapieansatz erprobt. Die Ergebnisse klinischer Studien sind auf diesem Gebiet sehr uneinheitlich. So konnte für Rivastigmin oder Donepezil keine signifikante Verbesserung der Kognition festgestellt werden (Voß 2008), während eine Studie von *Schubert et al.* (2006) positive Effekte von Galantamin hinsichtlich den Kriterien „Aufmerksamkeit“ und „verzögertem Gedächtnisabruf“ zeigte.

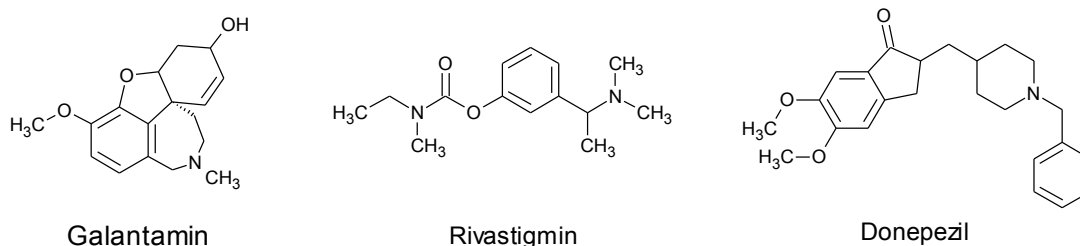


Abbildung 1.3.1 Beispiele klinisch relevanter Cholinesterase-Inhibitoren

1.4 *In vivo*-Untersuchungen mit Neuroleptika

Da die Pathophysiologie der Schizophrenie noch nicht vollständig geklärt ist, sind geeignete Tiermodelle nötig, um die neuroleptische Potenz von Substanzen vorherzusagen oder gar neue Substanzklassen zu erschließen (Dawe 2009). Im Folgenden sollen die gängigsten Verhaltens-tests zur Identifizierung und Charakterisierung potenzieller Neuroleptika vorgestellt werden.

1.4.1 Tiermodelle für die Positivsymptomatik

Die Wirksamkeit von Neuroleptika gegenüber der Positivsymptomatik wird von zahlreichen Modellen hinreichend genau untersucht, so dass man zwischen *Conditioned Avoidance Response* (CAR)-Tests, Apomorphin-induziertem Klettern, Dopamin-Agonist-induzierter lokomotorischer Aktivität und dem *Paw-Test* wählen kann (Di Giovanni 2008).

Der CAR-Test beinhaltet, dass eine Fluchtreaktion auf einen zuvor antrainierten Reiz (bedingte Reaktion) nach Gabe eines Neuroleptikums nicht mehr stattfindet. Die Fluchtreaktion auf natürliche Reize (unbedingte Reaktion) sollte dabei nicht beeinträchtigt werden. Alle antipsychotischen Substanzen inhibieren selektiv CAR, während andere Substanzklassen entweder CAR gar nicht reduzieren oder erst in Dosen, in denen sie auch die natürliche Fluchtreaktion beeinflussen (Wadenberg 1999). Damit hat dieses Tiermodell eine hohe Vorhersagekraft für die antipsychotische Wirksamkeit von Substanzen. Häufig wird dabei eine aktive Reaktion hervorgerufen, bei der das Tier einen Knopf drücken oder an einen bestimmten Ort der Apparatur springen muss. Weniger für Neuroleptika verwendet wird der passive CAR-Test, da bei diesem Angst und Lernen eine übergeordnete Rolle spielen. Hierbei wird zumeist das Verbleiben in einem Kompartiment der Apparatur, welches sonst nicht bevorzugt wird, getestet (Geyer 2003). Neben der in dieser Arbeit angewendeten einseitigen aktiven Avoidance, bei welcher das Tier immer von demselben Kompartiment ausgehend reagieren muss (zum Beispiel Stabsprung-Test, Abbildung 1.4.1), ist auch eine zweiseitige aktive Avoidance (zum Beispiel *Shuttle-Box-Test*) möglich. Bei diesem Experiment sollte das Tier nach einem Signal in das jeweils andere Kompartiment der Apparatur laufen, um einem Stromreiz zu entgehen (Levis 1973). Allerdings ist hierbei zu bedenken, dass die Reaktion des Tieres emotional beeinflusst werden könnte, da es immer wieder in das Kompartiment zurück kehren muss, in dem es zuvor geschockt wurde (Becker 2008).

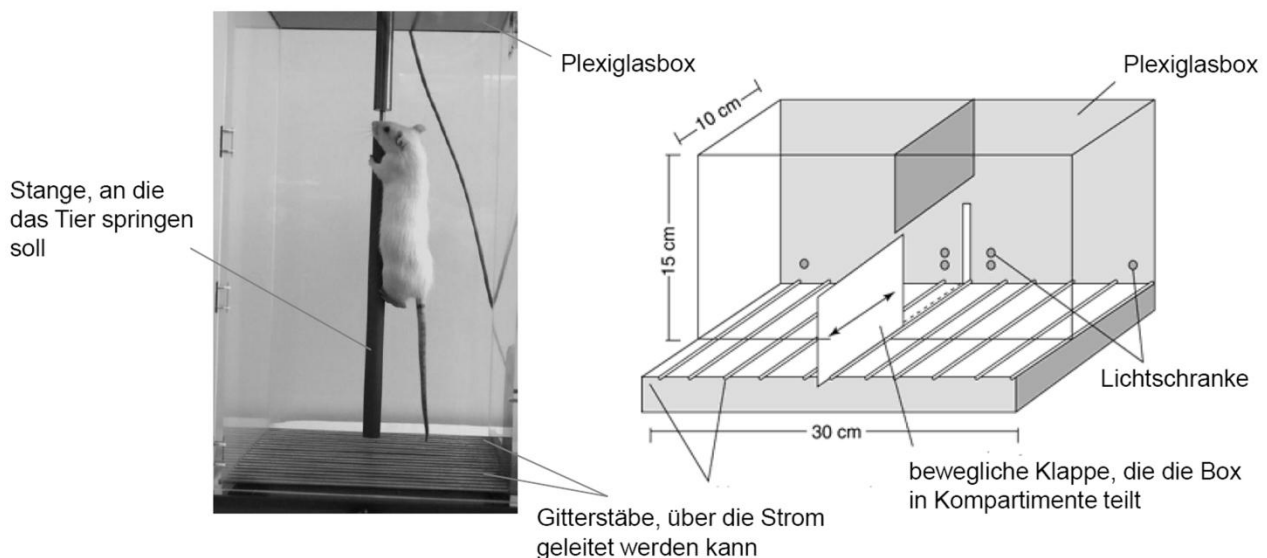


Abbildung 1.4.1 Versuche zur inhibitorischen Wirkung von Neuroleptika auf CAR
Stabsprung-Test (links), *Shuttle Box-Test* (rechts, modifiziert nach Anisman et al. (2001))

Ausgehend von der *Dopaminhypothese* ist die neuroleptische Potenz auch über die Reduzierung von durch Dopamin-Agonisten ausgelösten Verhaltensänderungen zu ermitteln. Mäuse, denen Apomorphin gegeben wird, nehmen vorrangig eine vertikale Haltung am Rande ihres Käfigs ein. Für diesen Effekt scheinen striatale Dopamin-Rezeptoren von Bedeutung zu sein. *Protais et al.* (1976) entwickelten aus dieser Beobachtung einen Tierversuch zur Bestimmung der

neuroleptischen Potenz anhand der Inhibition des Apomorphin-induzierten Kletterns. In einem weiteren Testmodell wird ausgenutzt, dass durch eine Dopamin-Überfunktion im mesolimbischen System auch die Fortbewegung (Locomotion) gesteigert wird. Daher kann durch Gabe von Dopamin-Agonisten wie Apomorphin eine gesteigerte lokomotorische Aktivität hervorgerufen werden, die durch Neuroleptika aufgrund ihrer D₂-antagonistischen Wirkung wieder gemindert werden sollte (Ellenbroek 1993). Beide Versuche beziehen sich ausschließlich auf den Dopamin-Antagonismus im mesolimbischen System. Ein Problem dieser Modelle stellt außerdem die sehr unterschiedliche Empfindlichkeit der Tiere auf Apomorphin dar (Davis 1986). Ein ähnlicher Test, welcher jedoch spezifisch für atypische Neuroleptika ist, nutzt NMDA-Antagonisten, um eine gesteigerte lokomotorische Aktivität hervorzurufen. Während auch selektive 5-HT_{2A}-Antagonisten die lokomotorische Aktivität in diesem Versuch hemmen, können klassische Neuroleptika aufgrund ihrer geringen Affinität zu Serotonin-Rezeptoren keinen Einfluss nehmen (Gleason 1997).

Der *Paw-Test* bedient sich eines völlig anderen Ansatzes, der die Untersuchung von neuroleptischer Potenz und extrapyramidalen Nebenwirkungen in einem Testmodell vereint. Dieses Experiment beruht auf der Beobachtung, dass alle Neuroleptika das Zurückziehen der Hinterpfoten, wenn diese gestreckt werden, hemmen, was weder durch Morphin, noch durch Benzodiazepine beeinflusst werden kann. Das Zurückziehen von gestreckten Vorderpfoten scheint ein Kriterium für das Auftreten von extrapyramidalen Symptomen zu sein (Ellenbroek 1987).

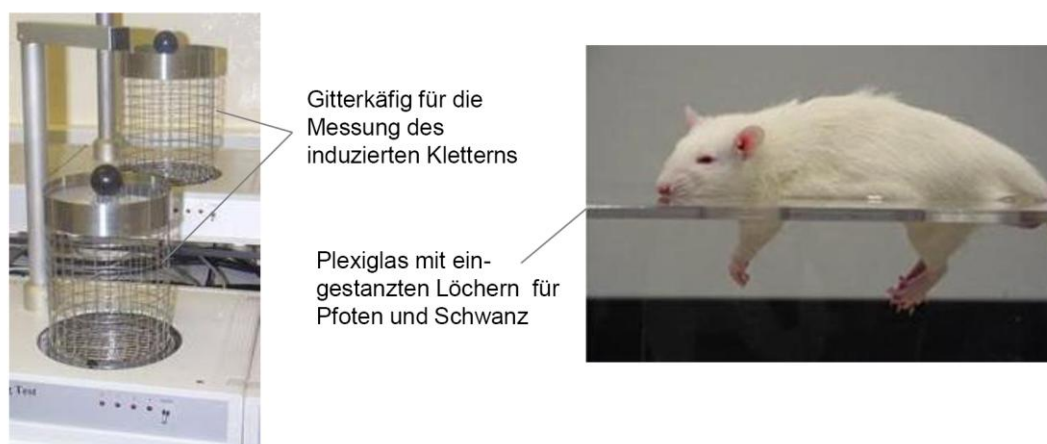


Abbildung 1.4.2 Apparaturen für das Apomorphin-induzierte Klettern und den Paw-Test
(links, modifiziert nach *Drinkenburg et al.* (2000), rechts, Photo überlassen von *Dept. Cognitive Neuro Science*, Nijmegen)

Andere Testmodelle wie die Präpulsinhibition (Geyer 2003), die latente Inhibition (Feldon 1992) oder die sensorische Verknüpfung akustischer Reize (Stevens 1991) spielen eine eher untergeordnete Rolle bei der Ermittlung der neuroleptischen Potenz von Substanzen.

1.4.2 Tiermodelle für die Negativsymptomatik

Für die Negativsymptomatik gibt es bisher nur wenige Modelle, da sich Eigenschaften wie emotionale Gleichgültigkeit, Willenlosigkeit, Apathie oder Aufmerksamkeitsstörungen schwer in Tierversuchen fassen lassen. Neben klassischen kognitiven Testsystemen, wie dem *Morris Water Maze*, bei dem die Tiere trainiert werden, eine nicht sichtbare Plattform in einem Wasserbehälter wiederzufinden, sind dies vor allem Versuche, die den sozialen Rückzug und Freudlosigkeit in den Vordergrund stellen.

Durch den NMDA-Antagonisten Phencyclidin, aber auch durch Dopamin-Agonisten wie Amphetamin kann sozialer Rückzug induziert werden (Ellenbroek 1990). Ähnlich dem Symptom bei Schizophreniepatienten trennen sich die Tiere bei Gabe dieser Substanzen aktiv von der Gruppe und vermeiden den Kontakt zu anderen Tieren. Diese Effekte können durch klassische und atypische Neuroleptika behoben werden (Ellenbroek 1996; 2000).

Desweiteren wird versucht, eine wie bei Schizophrenie beobachtete Freudlosigkeit (Anhedonie) auszulösen und das Verbessern dieses Zustandes durch Neuroleptika zu untersuchen. Leider sind bislang keine Substanzen bekannt, die diesen Zustand in ausreichendem Maße hervorrufen (Ellenbroek 2000).

Ketamin induzierte Verhaltensänderungen wurden von *Becker et al.* (2004) untersucht. Subchronische Applikationen dieses NMDA-Antagonisten induzieren vermehrt aggressives Verhalten, welches durch atypische Neuroleptika, aber nicht durch Haloperidol gemindert werden kann. Gleiche Effekte, die ebenfalls nur durch atypische Antipsychotika aufgehoben werden können, werden auch durch postnatale Läsionen im ventralen Hippocampus und durch Phencyclidin erzeugt (Sams-Dodd 1998; Becker 2003).

1.4.3 Tiermodelle für extrapyramidale und motorische Nebenwirkungen

Neuroleptika haben zahlreiche Nebenwirkungen, wie zum Beispiel Parkinson-ähnliche Symptome, verlangsamte Lokomotion, Depressionen, Gewichtszunahme oder erhöhte Serum-Prolaktinspiegel. Die weitaus häufigsten Nebenwirkungen, die bei ca. 20% der mit Neuroleptika behandelten Patienten auftreten, sind EPS, für die im Folgenden die gängigsten Tiermodelle vorgestellt werden sollen.

Eine Methode, die sehr genau die Zustände beim schizophrenen Menschen widerspiegelt, ist die Beobachtung der Dystonie bei Affen (Migler 1993; Casey 1996). Die zu untersuchenden Antipsychotika werden über mehrere Tage verabreicht und auftretende Dyskinesien in regelmäßigen Abständen notiert und in Scores zusammengefasst. Da allerdings mit Affen die neuroleptische Potenz nur schwer zu ermitteln ist, ist der Aussagewert für die therapeutische Breite nur sehr begrenzt (Geyer 2003).

Der *Paw-Test*, welcher antipsychotische Wirksamkeit und EPS gleichermaßen voraussagen kann, wurde in Kapitel 1.4.1 bereits beschrieben. Für die Nebenwirkungen scheint dabei ausschließlich die verlängerte Zeit bis zum Zurückziehen der Vorderpfoten ausschlaggebend zu sein.

Das am häufigsten genutzte Tiermodell für extrapyramidale Symptome ist die Auslösung der Katalepsie. Es ist ein Zustand der temporären motorischen Unbeweglichkeit. In diesem werden Körperhaltungen unnatürlich lange eingehalten, auch wenn sie von außen herbeigeführt wurden oder unbequem sind (Munkvad 1968; de Oliveira 2006). Das Phänomen selbst tritt zum einen häufig bei der Parkinsonschen Erkrankung oder ähnlichen neurologischen Störungen auf, kann aber auch durch Medikamente herbeigeführt werden (Wadenberg 1996; de Oliveira 2006). Bestimmt wird das Auftreten von Katalepsie, indem die Dauer gemessen wird, in der ein Tier in der unnatürlichen Position, in die es versetzt wird, verbleibt. Es ist dabei unerheblich, ob das Tier auf ein geneigtes Gitter (*Declined-grid-Test*), mit den Vorder- oder Hinterpfoten auf einen Holzpflöck oder eine Stange gesetzt wird (*Bar-Test*, Abbildung 1.4.3) oder ob man die Extremitäten überkreuzt (*Cross-Leg-Test*, Abbildung 1.4.3) (Klemm 2001).

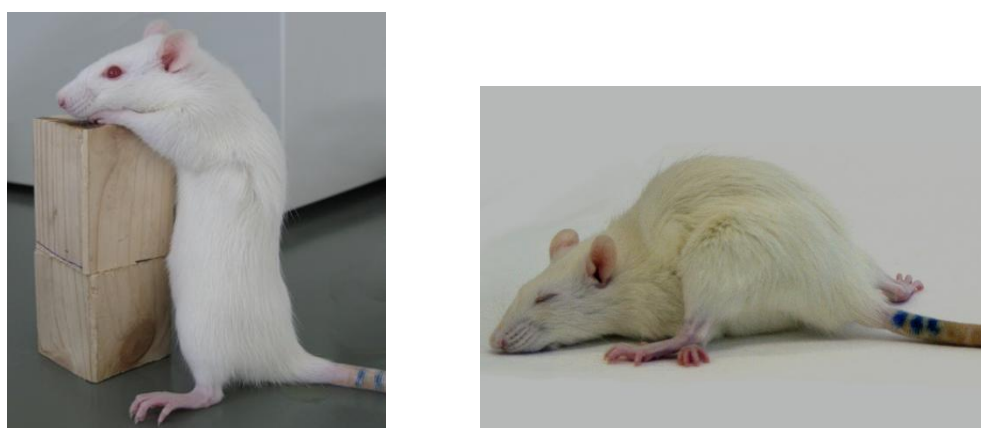


Abbildung 1.4.3 Katalepsie-Tests: *Bar-Test* (links), *Cross-Leg-Test* (rechts)

1.5 Bisannelierte Hexahydroazecine als potenzielle Neuroleptika

Die Bedeutung der beiden Neurotransmitter Dopamin und Serotonin für die Pathophysiologie der Schizophrenie und die Vorteile von $D_2/5\text{-HT}_{2A}$ -Antagonisten bei der Behandlung dieser Erkrankung führten zu Versuchen, die Grundstrukturen beider Neurotransmitter in einem Molekül zu vereinigen. Damit sollte erreicht werden, dass sowohl Serotonin- als auch Dopamin-Rezeptoren mit nur einem Wirkstoff blockiert werden können und man somit den Nachteilen der gleichzeitigen Gabe mehrerer Wirkstoffe, wie chemische und pharmakokinetische Interaktionen, entgehen kann.

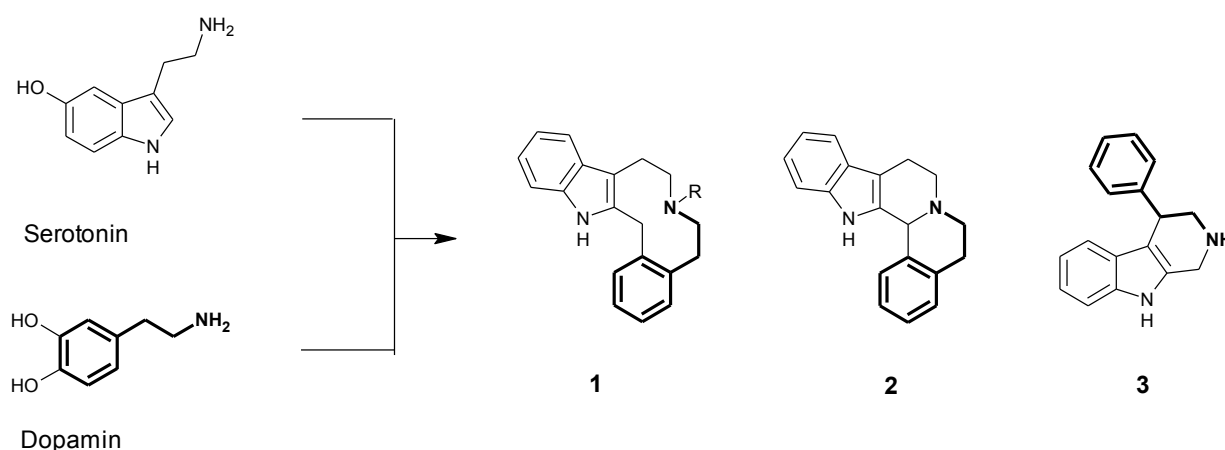


Abbildung 1.5.1 Leitstrukturentwicklung ausgehend von den Grundstrukturen von Serotonin und Dopamin

Von den drei entstandenen Substanzklassen (siehe Abbildung 1.5.1) zeigten die Hexahydrobenzindolo[*d,g*]azecine (**1**) hohe antagonistische Aktivitäten an Dopamin-Rezeptoren im nanomolaren Bereich, während die starrereren aromatisch annelierten Tetrahydrobenzindolochinolizine (**2**) und 4-Aryl-tetrahydro-β-carboline-Derivate (**3**) keine messbaren Affinitäten zu Dopamin-Rezeptoren bei Konzentrationen bis zu 10 μM aufwiesen (Lehmann 1993; Witt 2000; Decker 2004). In späteren Arbeiten wurde auch eine hohe Affinität von Hexahydrobenzindolo[*d,g*]azecinen zu 5-HT_{2A} -Rezeptoren und die antagonistischen Eigenschaften an diesen Rezeptoren bestätigt (Hamacher 2006; Hoefgen 2006; Enzensperger 2008).

Sowohl für Dopamin- als auch für 5-HT_{2A} -Rezeptoren gibt es bisher weder Röntgenstrukturen noch geeignete Homologiemodelle, welche verlässliche und aussagekräftige *in silico*-Studien zur Strukturoptimierung zulassen würden. So ist man darauf angewiesen, durch Struktur-Wirkungs-Beziehungen (SAR) Rückschlüsse auf mögliche Konformationen der Rezeptorbindungstasche zu ziehen. Dazu möchte die vorliegende Arbeit einen Beitrag leisten.

Strukturoptimierungen mittels Radioligandbindungsstudien führten bereits in früheren Arbeiten zu mehreren Erkenntnissen für die Dopamin-Rezeptor-Affinitäten von $[d,g]$ -Azecinen:

- Als Aromaten sind besonders Benzol und Indol geeignet.
- Es scheint günstig zu sein, wenn die beiden aromatischen Systeme unterschiedliche Elektronendichten aufweisen.
- Der Azecin-Stickstoff sollte eine Methylgruppe tragen. Größere Reste verschlechtern die Affinität zu Dopamin-Rezeptoren.
- Die 10-Ring-Derivate zeigen höhere Affinitäten als ringerweiterte und ringverkleinerte Homologe.

Durch derartige SAR kristallisierten sich 7-Methyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo $[d,g]$ azecin-3-ol (LE404) und 7-Methyl-6,7,8,9,14,15-hexahydro-5H-indolo $[3,2-f]$ [3]benzazecin (LE300, siehe Abbildung 1.5.2) als Leitstrukturen für die Entwicklung potenzieller Neuroleptika heraus (Kassack 2002; Hoefgen 2006; Mohr 2006; Enzensperger 2007b).

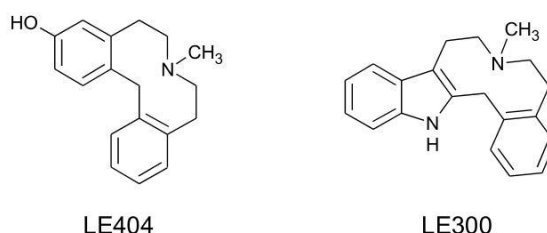


Abbildung 1.5.2 Leitstrukturen der $[d,g]$ -Azecine

Die Rezeptorbindungsprofile der untersuchten $[d,g]$ -Azecine an Dopamin-Rezeptorsubtypen sind sehr unterschiedlich. Vornehmlich handelt es sich bei den zweifach aromatisch annelierten $[d,g]$ -Azecinen um Verbindungen mit besonders hohen $D_1/D_5/5\text{-HT}_{2A}$ -Rezeptor-Affinitäten. Allerdings trifft diese Selektivität nicht für alle $[d,g]$ -Azecine zu, was auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Keines der untersuchten $[d,g]$ -Azecine wies agonistische Eigenschaften auf, so dass es sich ausschließlich um Antagonisten an Dopamin- und 5-HT_{2A} -Rezeptoren handelt.

Bislang wurden keine *in vivo*-Studien zur neuroleptischen Potenz an $[d,g]$ -Azecinen durchgeführt. Ausschließlich LE300 wurde in Lokomotionsstudien und Experimenten zu Sucht reduzierenden Eigenschaften untersucht. Letzteres konnte durch die Beeinträchtigung der Lokomotion nicht eindeutig nachgewiesen werden (Decker 2006).

1.6 Bivalente Verbindungen

Die Entwicklung bivalenter Verbindungen führte in vielen Bereichen von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Messer 2004; Peng 2007), aber auch an Enzymen, wie Acetyl- (AChE) (Du 2004) und Butyrylcholinesterase (BChE) (Decker 2006) zu einer deutlichen Steigerung der Aktivität und

Selektivität. Dieser sogenannte *Bivalent Ligand Approach* schließt homobivalente Verbindungen, in denen zwei gleiche Moleküle über Spacer miteinander verbunden sind und heterobivalente Verbindungen mit unterschiedlichen monomeren Teilstrukturen ein. Oft ist dabei die Spacer-Länge entscheidend für die Wirksamkeit bivalenter Strukturen (Decker 2007). An der Acetylcholinesterase wird die gesteigerte enzyminhibierende Wirkung bivalenter Verbindungen durch eine Interaktion mit einer zweiten Bindungsstelle hervorgerufen, während eine solche für BChE und die meisten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren nicht bekannt ist (Du 2004). Der *Bivalent Ligand Approach* an GPCRs hingegen basiert auf der Erkenntnis, dass viele dieser Rezeptoren di- bzw. oligomere Rezeptorkomplexe ausbilden. Bivalente Liganden mit optimalen Spacerlängen können somit entweder über die Bindung an benachbarte Bindungsstellen oder durch Stabilisierung der bivalenten Strukturen eine erhöhte Bindungsaffinität bzw. Wirkung an GPCRs aufweisen (George 2002).

Einen großen Nachteil bivalenter Verbindungen sieht man in der Größe der Moleküle. So könnte die orale Bioverfügbarkeit, aber auch die Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit, die gerade für Substanzen gegen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) unerlässlich ist, eingeschränkt oder nicht vorhanden sein (Pajouhesh 2005). Interessanterweise zeigen einige bivalente Verbindungen keinerlei Einschränkungen in diesen pharmakokinetischen Parametern (Decker 2007), so dass der *Bivalent Ligand Approach* auch für die Arzneistoffentwicklung bei ZNS-Erkrankungen Anwendung finden sollte.

1.7 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollten zum einen bereits bestehende Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Hexahydrodibenzazecinen durch neu synthetisierte Verbindungen ausgeweitet und zum anderen die neuroleptische Potenz einiger *[d,g]*-Azecine in *in vivo*-Modellen untersucht werden. Dabei spielten folgende Fragestellungen eine Rolle:

1. Ist das feste Annelierungsschema der *[d,g]*-Azecine eine Notwendigkeit für die hohen Dopamin-Rezeptor-Affinitäten?

Bislang wurden nur *[d,g]*-kondensierte Hexahydrodibenzazecine bei den Untersuchungen an Dopamin-Rezeptoren berücksichtigt, obwohl schon in den 1970er Jahren Hexahydrodibenzo[*c,g*]azecine (im Folgenden als *[c,g]*-Azecine bezeichnet) als analgetische und sedierende Verbindungen patentiert wurden (Yoshiro 1976). Die Beobachtung bei *[d,g]*-Azecinen, dass nur die 10-Ring-Derivate, nicht aber ihre rigideren, tetrazyklischen Vorstufen hohe Affinitäten zu Dopamin-Rezeptoren zeigten, sollte auf andere Annelierungsmuster übertragen werden. Stepholidin bzw. Dihyrexidin, welche Tetrazyklen ähnlich den zweifach aromatisch annelierten Tetrahydro-*[d,g]*chinolizinen (im Folgenden kurz *[d,g]*-Chinolizine) mit anderem Kondensationsmuster darstellen, sind bekannte affine Dopamin-Liganden (Lovenberg 1989; Jin 2002). Es war daher besonders interessant, ob die Affinitäten von Derivaten dieser Verbindungen durch eine Ringöffnung zu *[c,g]*-Azecinen noch gesteigert werden kann. Um vergleichbare Ergebnisse für unterschiedlich annelierte Azecine zu erhalten, sollten 3-Methoxy- und 3-Hydroxy-substituierte Derivate synthetisiert und untersucht werden (siehe Abbildung 1.7.1).

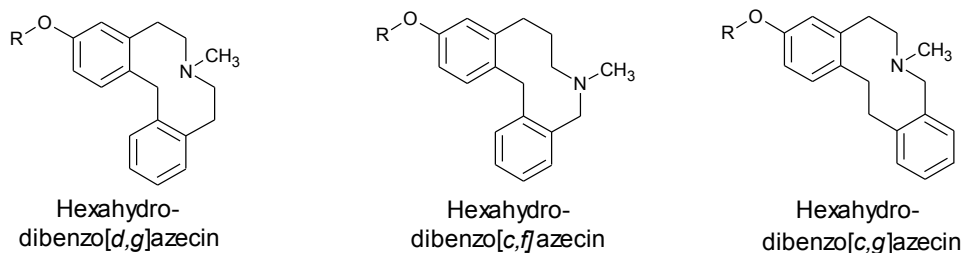


Abbildung 1.7.1 Hexahydrodibenzazecine mit verschiedenen Annelierungsmustern

2. Hat eine Ringerweiterung des zentralen 10-Rings bei Hexahydrodibenzo[*c,g*]azecinen Einfluss auf die Dopamin-Rezeptor-Affinitäten?

Für annelierte *[d,g]*-Azecine zeigten sich durch eine Ringerweiterung zu 11-Ringen sehr heterogene Ergebnisse an Dopamin-Rezeptoren (Enzensperger 2006; 2007b). Während ringerweiterte Homologe der Hexahydrodibenzo[*d,g*]azecine ähnliche Affinitäten zu Dopamin-Rezeptoren aufwiesen wie die 10-Ring-Derivate, erhielt man bei den Hexahydrobenzindolo[*d,g*]azecinen unterschiedliche Ergebnisse für die Isomere. Dieser Ansatz der Ringerweiterung sollte nun auf die

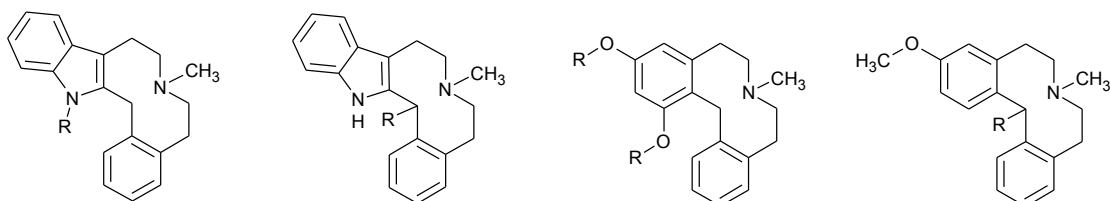
Hexahydrodibenzo[*c,g*]azecine übertragen (siehe Abbildung 1.7.2) und nach Erklärungen für das unterschiedliche Verhalten der Isomere gesucht werden.



Abbildung 1.7.2 Ringerweiterte Derivate der Hexahydrodibenzo[*c,g*]azecine

3. Welche Auswirkung haben Substituenten zwischen den Aromaten auf die Bindungsaffinitäten von [d,g]-Azecinen an Dopamin-Rezeptoren?

Eine Indol-*N*-Methylierung an der Leitstruktur LE300 führte zu erstaunlichen Affinitäten am D₅-Rezeptor und zu einem neuen Selektivitätsprofil an den Dopamin-Rezeptor-Subtypen (Enzensperger 2007a). In neueren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass nur eine Methylgruppe am Indol-*N* zur Affinitätssteigerung führt, längere Ketten hingegen sich negativ auf die Bindungsaffinitäten an Dopamin-Rezeptoren auswirken (Robaa 2010b). Es lag daher die Vermutung nahe, dass in der Rezeptorbindungstasche noch Raum für kleine Substituenten zwischen den Aromaten vorhanden ist, was anhand der in Abbildung 1.7.3 dargestellten Verbindungen untersucht werden sollte.



N-substituiertes LE300

Abbildung 1.7.3 Derivate mit Substituenten zwischen den Aromaten (R=H, CH₃, CH₂CH₃)

4. Binden bisannelierte Hexahydroazecin- oder Tetrahydrochinolizin-Derivate mit permanenter Ladung am Stickstoff an Dopamin-Rezeptoren?

Verbindungen mit tertiärem, basischem Stickstoff können an Rezeptoren auch in der *N*-protonierten Form binden. Solch eine geladene Teilstruktur kann durch Interaktionen mit einzelnen Aminosäuren des Rezeptors einen erheblichen Einfluss auf die Affinitäten der Liganden haben. Dies ist auch für Dopamin-Rezeptoren beschrieben (Andujar 2008; Torrice 2009).

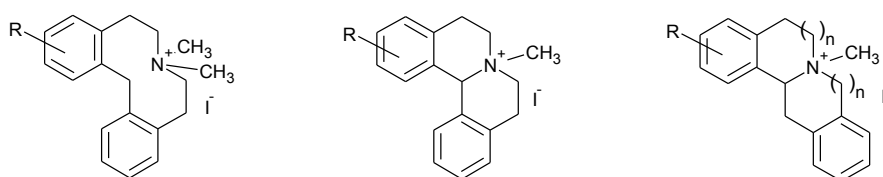


Abbildung 1.7.4 Hexahydrodibenzazecinium- und Tetrahydrodibenzochinolizinium-Derivate (R=H, OH, OCH₃)

Es sollte nun untersucht werden, wie sich Hexahydroazecin- oder Tetrahydrochinolizin-Derivate mit permanenter Ladung am Stickstoff (vgl. Abbildung 1.7.4) hinsichtlich ihrer Affinitäten zu Dopamin-Rezeptoren verhalten und ob dadurch die oben erwähnten Interaktionen mit dem Rezeptor bestätigt werden können.

5. Haben homobivalente Verbindungen der Hexahydrodibenzo[d,g]azecine, sowie deren Vorstufen eine Wirkung auf Cholinesterasen und an Dopamin-Rezeptoren?

Eine adjuvante Gabe von Galantamin, einem Cholinesterase-Inhibitor, hatte bei Schizophrenie-Patienten einen positiven Effekt auf die kognitiven Fähigkeiten (Schubert 2006). Die synthetischen Vorstufen der Hexahydrodibenzo[d,g]azecine, aber auch die [d,g]-Azecine selbst, zeigen eine gewisse Ähnlichkeit zu Galantamin. Daher sollte unter Anwendung des *Bivalent Ligand Approach* (vgl. Kapitel 1.6) untersucht werden, ob durch homobivalente [d,g]-Chinolizin-, [d,g]-Chinolizinium- oder [d,g]-Azecin-Derivate sowohl Wirkungen an Dopamin-Rezeptoren als auch an Cholinesterasen hervorgerufen werden können.

6. Wirken [d,g]-Azecine toxisch auf menschliche Hirnzellen? Gibt es Struktur-Wirkungs-Beziehungen hinsichtlich einer möglichen Zytotoxizität?

Neben der Aktivität spielt auch die pharmakologische Unbedenklichkeit eine große Rolle für die Entwicklung neuer Arzneistoffe. Es sollte daher *in vitro* an menschlichen Glia- und neuronalen Zellen, den beiden Hauptzelltypen des zentralen Nervensystems, die Wirkung der Substanzen auf die Zellviabilität untersucht werden. Damit sollte zum einen sicher gestellt werden, dass bei wirksamen Konzentrationen im Gehirn die Substanzen nicht toxisch wirken. Zum anderen sollten die Befunde in die bisherigen Struktur-Wirkungs-Beziehungen mit einbezogen werden. Dadurch wäre es möglich, Substanzen zu identifizieren, die eine möglichst große Wirksamkeit bei gleichzeitig geringer Toxizität aufweisen und somit für *in vivo*-Versuche geeignet sind.

7. Wie hoch ist die neuroleptische Potenz von [d,g]-Azecinen in vivo? Zeigen [d,g]-Azecine weniger EPS als Haloperidol und gehören damit zu den atypischen Neuroleptika? Korrelieren in vitro- und in vivo-Ergebnisse?

Leitstrukturentwicklung, Strukturoptimierung und pharmakologische *in vitro*-Charakterisierungen zu [d,g]-Azecinen wurden im Rahmen bisheriger Arbeiten umfassend durchgeführt (Witt 2000; Hoefgen 2006; Mohr 2006). Nun sollte die neuroleptische Potenz dieser Substanzklasse auch in Tiermodellen bestätigt werden. Zudem war es interessant, inwiefern die Serotoninkomponente im Molekül zu einem besseren Nebenwirkungsprofil hinsichtlich der EPS führt. Weiterhin sollte untersucht werden, ob die *in vivo*-Ergebnisse mit den *in vitro* ermittelten Bindungen an einzelnen Rezeptor-Subtypen korrelieren.

2 Manuskripte

Im Folgenden sind die im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Publikationen abgebildet. Eine kurze inhaltliche Übersicht, zusammen mit dem eingereichten *Graphical Abstract* und der Beschreibung des jeweiligen Eigenanteils ist auf gesonderten Seiten vor jeder Publikation gegeben.

Bei den fünf vorgestellten Arbeiten handelt es sich um folgende Themengebiete:

Publikation 1:

Veränderungen am Annelierungsmuster der Hexahydrodibenzo[*d,g*]azecine

Publikation 2:

Ringerweiterungen an Hexahydrodibenzo[*c,g*]azecinen

Publikation 3:

In vivo-Versuche mit Hexahydrodibenzo- und -benzindolo[*d,g*]azecinen

Publikation 4:

Bivalente Verbindungen als Cholinesterase-Inhibitoren

Publikation 5:

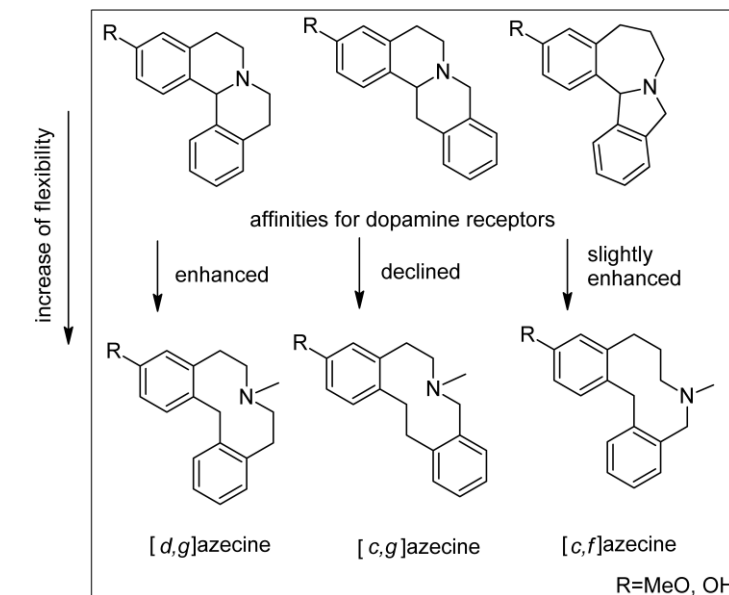
Kleine Substituenten zwischen den beiden aromatischen Pharmakophoren

Publikation 1

Dibenzazecine Scaffold Rebuilding – Is the Flexibility always Essential for High Affinities at Dopamine Receptors?

Maria Schulze, Franziska K. U. Müller, Jennifer M. Mason, Helmar Görls,
Jochen Lehmann und Christoph Enzensperger
Bioorg Med Chem **2009**, 17 (19): 6.898-6.907.

In dieser Arbeit wurden verschiedenartig annelierte Hexahydrodibenzazecine und deren tetrazyklischen Synthesevorstufen synthetisiert und hinsichtlich ihrer Affinität zu Dopamin-Rezeptoren verglichen. Zudem gelang es, Röntgenkristallstrukturen je eines [c,g]- und [c,f]-Azecin-Derivates zu erhalten. Aus diesen Ergebnissen konnten Struktur-Wirkungs-Beziehungen zum Grundgerüst der Azecine abgeleitet werden. Es wurde gezeigt, dass das Annelierungsmuster entscheidend für die hohen Affinitäten der [d,g]-Azecine ist. Bei den tetrazyklischen Vorstufen erwies sich hingegen eine [c,g]-Annelierung als besonders günstig für die Bindung zu Dopamin-Rezeptoren.



Graphical Abstract

Eigenanteil: Synthese und Charakterisierung der [c,g]-annelierten Derivate, darunter sechs bisher in der Literatur nicht beschriebene Verbindungen. Herstellung der Kristalle für die Röntgenstrukturanalyse. Interpretation der Daten aus den pharmakologischen Assays. Erstellung des Manuskripts.



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

Dibenzazecine scaffold rebuilding—Is the flexibility always essential for high dopamine receptor affinities?

Maria Schulze^a, Franziska K. U. Müller^a, Jennifer M. Mason^b, Helmar Görls^c, Jochen Lehmann^a, Christoph Enzensperger^{a,*}

^a Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische/Medizinische Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Philosophenweg 14, 07743 Jena, Germany

^b Industrial Research Ltd, PO Box 31-310, Lower Hutt, New Zealand

^c Institut für Anorganische und analytische Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, August-Bebel-Str. 2, 07743 Jena, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 May 2009

Revised 8 August 2009

Accepted 13 August 2009

Available online 20 August 2009

Keywords:

Dopamine receptor

Azecines

SAR

Heterocyclic compounds

ABSTRACT

The moderately flexible 7-methyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo[d,g]azecines are known to be potent dopamine receptor antagonists, whereas the corresponding rigid dibenzo[d,g]quinolizines are inactive. We built the scaffolds of dibenzo[c,g], [c,f]- and -[d,f]azecines and together with their ring closed, more rigid precursors, evaluated the affinities for the human D₁–D₅ receptors (radioligand binding) as well as the functionalities (calcium assay) and thus investigated the influence of annelation and conformational flexibility of these compounds on their affinity for human cloned dopamine receptors.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The dopaminergic system plays an important role in regulating neuronal motor control, cognition, emotion, and vascular function. Dopamine antagonists are commonly used as antipsychotic drugs. It is now widely accepted for GPCRs of the amine cluster (i.e., dopamine, serotonin, norepinephrine, or histamine receptors) that antagonists mostly interact with two different hydrophobic areas and an anionic aspartate in the receptor's binding cavity.¹ This might explain why most of the antagonists have two aromatic moieties to interact with the abovementioned two hydrophobic sites, and a chargeable basic nitrogen which is crucial for the formation of an ionogenic salt-bridge to the aspartate anion in the binding pocket. It is not clarified yet, in what relative positions these three pharmacophores should be, to gain maximum affinity for the respective GPCRs. Changing the relative distances and angles of these structural elements may give more insights into receptor ligand interactions.

The rather flexible and symmetric dibenzo[d,g]azecines (e.g., **3**, **4**) are highly potent antagonists at the D₁-receptor subtype family (D₁ and D₅). For these azecines 3-hydroxy-derivatives show an advantage over 3-methoxy-substituted compounds. In contrast, the analogous, more rigid dibenzo[d,g]quinolizines (e.g., **1**, **2**) do not show any affinity.^{2,3} So, obviously, the higher conformational

mobility of the 10-membered dibenzo[d,g]azecines facilitates the binding to dopamine receptors. On the other hand, some dibenzoquinolizines such as stepholidine and chloroscoulerine, exhibit nanomolar affinities for the D₁ and D_{2L} receptors, and also the rather constrained dihydrexidine, a dibenzoquinoline derivative, is a highly potent D₁ agonist.^{4–6} The scaffolds of the homologous dibenzazecines only differ in the position of the second annulated benzene moiety (Fig. 1). We therefore planned to synthesize dibenzazecines **7**, **8**, **10**, **11** and their tetracyclic precursors **5**, **6**, and **9**. To obtain meaningful information for SAR-studies on the changed scaffolds, dibenzo[d,g]-, -[c,f]- and -[c,g]azecines were synthesized with the same substitution pattern, which is based on the previously investigated potent dopamine antagonists 3-methoxy- and 3-hydroxy-7-methyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo[d,g]azecine (**3**, **4**).^{2,3} The affinities of compounds **1**–**11** and the two enantiomers of dibenzo[d,f]azecine **12**⁷ (Fig. 2) were measured for all dopamine receptor subtypes by radioligand binding experiments. The functionality of all compounds was determined by a functional calcium assay.³

2. Results

2.1. Chemistry

The synthesis of compounds **7**–**11** is described in Schemes 1 and 2. In order to obtain the dibenzo[c,g]azecines **7**, **8** and the dibenzo[c,f]azecines **10**, **11**, we first synthesized the appropriate

* Corresponding author. Tel.: +49 3641 949820; fax: +49 3641 949802.

E-mail address: ch.enzensperger@uni-jena.de (C. Enzensperger).

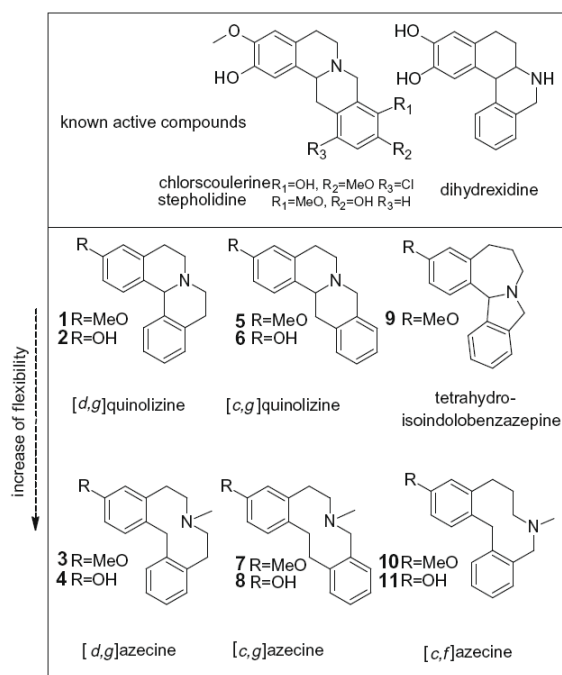


Figure 1. The underlying tetracyclic compounds and resulting azecines.

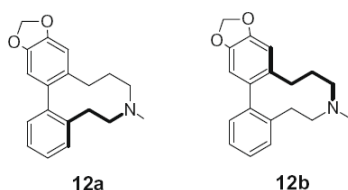
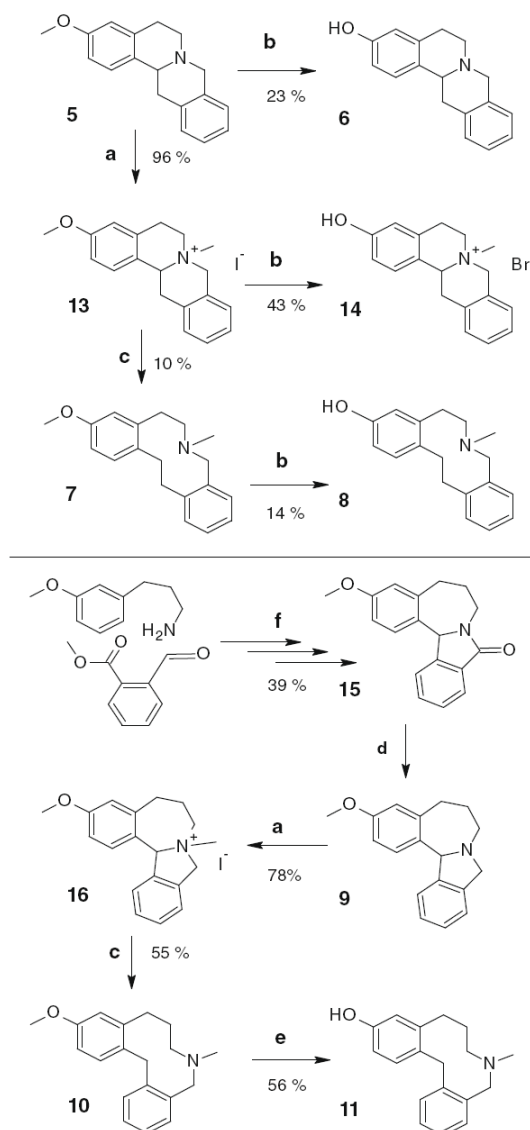


Figure 2. Dibenzo[d,f]azecines.

tetracyclic precursor molecules **5** and **9** and converted them to their quaternary salts **13** and **16** with methyl iodide in acetonitrile. Birch conditions ($\text{Na}^0/\text{NH}_3^{\text{liq}}$) were used to obtain **7** and **10**. Cleavage of the methyl-ether moieties of the quaternary salt **13**, the dibenzo[c,g]quinolizine **5** and the [c,g]azecine **7** was accomplished by using hydrobromic acid in glacial acetic acid. Borontribromide in chloroform was used to prepare the phenol **11** in excellent yields, but for the ether cleavage of compounds **5** and **7** with borontribromide, no product could be isolated. Compound **5** was prepared as described previously starting from 3-methoxy-phenyl-ethylamine and 3-isochromanone.⁸ Compound **9** was obtained by lithium aluminum hydride reduction of the tetracyclic lactam (**15**), which was synthesized in three steps starting from methyl-2-formylbenzoate and 3-(3-methoxyphenyl)-propylamine via TiCl_4 mediated acyliminium cyclization as described by Heaney and Shuhaibar.⁹

Synthesis of the dibenzo[c,g]azecines **7** and **8** under Birch conditions turned out to be more complicated than observed for the preparation of dibenzo[d,g]azecines.² The cleavage yielded a side product in high yields due to the second benzylamine structure, as outlined in Scheme 2. Thus, ring opening of the quaternary salt **14** yielded almost exclusively (>90%) 2-methyl-1-(2-methylbenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-6-ol (**17**) instead of the desired azecine **8** and cleavage of the methoxy derivative **13** gave a mixture of 86% of 6-methoxy-2-methyl-1-(2-methylbenzyl)-

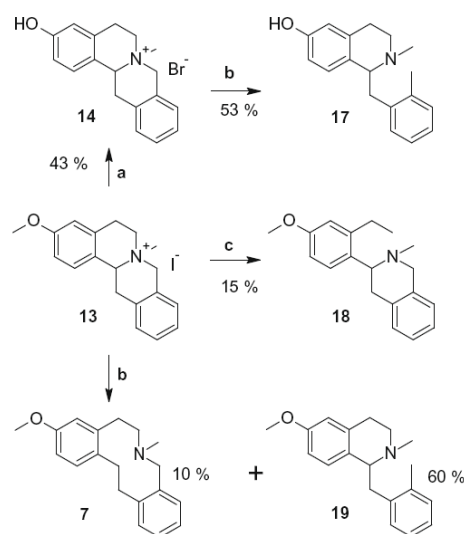


Scheme 1. Synthesis of the dibenzazecines **5**–**8**. Reagents and conditions: (a) methyl iodide, MeCN; (b) HBr, glacial acetic acid; (c) $\text{Na}/\text{NH}_3^{\text{liq}}$; (d) LiAlH_4 , THF; (e) BBr_3 , CHCl_3 ; (f) (i) toluene reflux; (ii) Na, methanol; (iii) TiCl_4 , CH_2Cl_2 .

1,2,3,4-tetra-hydroisoquinoline **19** and 14% of the desired azecine **7**. Both compounds were separated by column chromatography. In order to obtain better yields especially for the hydroxy derivative, we used a reaction sequence of Hofmann degradation followed by catalytic hydrogenation, which is described for known dibenzo[c,g]azecines.¹⁰ Unfortunately, starting with the quaternary salt **13** we only obtained 3-(2-ethyl-4-methoxyphenyl)-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinoline (**18**). All by-products were characterized by NMR and GC-MS and screened for their dopamine receptor affinities.

2.2. Pharmacological investigations

Using radioligand displacement experiments, we screened all dibenzazecines and ring-closed analogues, as well as the mentioned synthetic by-products, for their affinities for all human



Scheme 2. Synthetic by-products during cleavage of quaternary salt **11**. Reagents and conditions: (a) HBr, glacial acetic acid; (b) Na/NH₃^{liq}; (c) (i) Ag₂O, Methanol; (ii) DMSO; (iii) H₂/Pt₂O.

cloned dopamine receptor subtypes D₁–D₅ and determined the functionality for the D₁ and D_{2L} receptors in an intracellular calcium assay. K_i values for the radioligand binding assay are given in nM units (Table 1). A detailed protocol is described in Section 5.

3. Discussion

Both the constrained tetracyclic dibenzo[d,g]quinolizine derivatives **1** and **2** and their ring opened tricyclic analogues **3** and **4** contain a dopamine-like phenylethylamine moiety, but only the tricyclic and more flexible azecines **3** and **4** display high affinities for dopamine receptors. The 3-methoxy quinolizine derivative **1** shows slight affinity for the D₁ receptor, but almost 100 times weaker than the analogous azecine **3**.

It is known from literature that the tetrahydropyroberberines 12-chloroscoulerine and stepholidine, which are dibenzo[c,g]quinolizine derivatives, show high affinities for dopamine receptors.^{5,6} We now synthesized 3-methoxy and 3-hydroxy dibenzo[c,g]quinolizines (**5**, **6**), which show good affinities as well. As already recognized for the dibenzo[d,g]azecines,³ the hydroxy dibenzoquinolizine **6** exhibits a higher selectivity toward the D₁/D₅-receptors and higher affinities at these subtypes compared to the methoxy compound **5**. The modification in substitution pattern of stepholidine to compounds **5** and **6** lead to a change of functionality at D₁ receptors. While stepholidine is an agonist at this receptor subtype,⁵ our tested tetrahydropyroberberines (**5**, **6**) show antagonistic activities. It was now expected that ring opening of these potent tetracyclic compounds would increase affinities at all receptor subtypes. But surprisingly, both the hydroxy- and methoxy-substituted derivatives lost affinities nearly completely, despite the increased flexibility of the ring scaffold. Only at D₁ and D₅ receptors micromolar affinities can be detected for the methoxy compound (**7**). The hydroxy derivative does not show any advantage over the methoxy compound. The synthetic by-products **17**–**19** also show only weak micromolar or no affinities. Here, 1-benzyl-tetrahydroisoquinolines (**17**, **19**) turn out to be advantageous over the 3-phenyl-tetrahydroisoquinoline derivative (**18**), which shows very low affinities at all receptor subtypes. The selectivity of compounds **17** and **19** toward D₁ and D₂ receptors is an interesting observation and topic of our future investigations.

The dibenzo[c,f]azecines are of special interest since their scaffold can be seen as ring opened dihydrexidine derivative. Dihydrexidine is described as high-affinity dopamine agonist.⁴ While the tetracyclic precursor **9** shows very low affinities for all receptor subtypes, the 11-methoxy- and 11-hydroxy[c,f]azecines (**10**, **11**) show slight affinities for the D₁ receptor with micromolar K_i values. In contrast to dibenzo[d,g]azecines, but similar to dibenzo[c,g]azecines, the hydroxy compound **11** shows significantly lower affinities for D₁ receptors than the methoxy compound **10**. Surprisingly, at D₅ receptors, only the hydroxy derivative has a weak affinity. Though dihydrexidine shows agonistic activities at D₁ receptors,⁴ the investigated dibenzo[c,g]azecines, which structurally resemble dihydrexidine, exhibit weak antagonistic affinities.

The dibenzo[d,f]azecines **12a**, **b** exhibit low affinities for dopamine receptors with micromolar K_i values, comparable to the binding affinities of the dibenzo[c,g]-homologs **7**, **8** and the dibenzo[c,f]azecines **10**, **11**. Interestingly, the (+)-enantiomer **12a** has slight affinities for D₁ and D₅ receptors, while the corresponding (–)-enantiomer **12b** exhibits no measurable affinities. This correlates to observations made for 12-chloroscoulerine, where the two enantiomers show significant differences in their affinities for dopamine receptors. However, the racemic 12-chloroscoulerine displays almost the same activity as the active enantiomer.¹²

In the functional calcium assay all active compounds proved to be antagonists at D₁ and D_{2L} receptors. None of the tested compounds show agonistic activities. Hence, a change in the scaffold from dibenzo[d,g]- to other dibenzazecines seems to have no effect on functionality at dopamine receptors, while the substitution pattern, for example of dibenzo[c,g]quinolizines seems to have great impact on functionalities at dopamine receptors.

For the dibenzazecines **7** and **10** we could also obtain X-ray data (Fig. 3). Both compounds turned out to be angled in the crystal. Calculations of E-minimized conformations (*DS-visualizer*, *MOE*) gave for the dibenzo[c,g]azecine **7** a rather straight shape, which was also observed for E-minimized conformations of dibenzo[d,g]- and -[c,g]quinolizines (**1**, **2**, **5**, **6**). Measurement of distances between the aromatic centroids and the basic nitrogen in the crystal structure, as well as in the simulated E-minimized conformations, did not indicate a correlation between these distances and the observed affinities for dopamine receptors. Further molecular modeling studies are in progress.

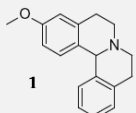
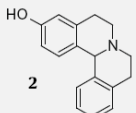
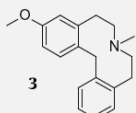
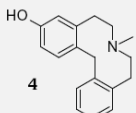
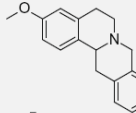
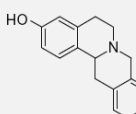
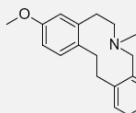
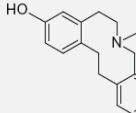
4. Conclusion

It can be summarized, that the annelation pattern in the tricyclic dibenzazecines and in the corresponding tetracyclic quinolizine and quinolizine-like derivatives highly influences the affinities, but not the functionalities at dopamine receptors. While dibenzo[d,g]azecines show nanomolar affinities for all dopamine receptors, dibenzo[c,f]-, -[c,g]- or -[d,f]azecines display micromolar K_i values for D₁ and D₅ receptor subtypes. All active test compounds turned out to act as antagonists.

Obviously, ring opening of dibenzo[d,g]quinolizines and the consequent increase in conformational flexibility, increases receptor affinities dramatically. The same effect occurs after ring opening of isoindoloazepine **9** to the dibenzo[c,f]azecines **10** and **11**, even though less pronounced. In spite of the close resemblance to the known dopamine receptor agonist dihydrexidine, these more flexible compounds, which represent a new tricyclic ring system, are antagonists with only moderate affinities.

The constrained dibenzo[c,g]quinolizines **5**, **6** exhibit the highest receptor affinities among all investigated ring-closed compounds. In contrast to the positive influence of ring opening on

Table 1Affinities (K_i) for dopamine D₁–D₅ receptor subtypes were determined by radioligand binding experiments

Compounds	Affinity for D ₁ , nM ($K_i \pm$ SEM)	Affinity for D _{2L} , nM ($K_i \pm$ SEM)	Affinity for D ₃ , nM ($K_i \pm$ SEM)	Affinity for D ₄ , nM ($K_i \pm$ SEM)	Affinity for D ₅ , nM ($K_i \pm$ SEM)
 1	2116 \pm 484 ^b	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000
 2	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000
 3	28.5 \pm 9.7 ^a	13.0 \pm 9.0 ^a	75.7 \pm 7.3 ^a	43.4 ^a	54 \pm 20 ^a
 4	0.39 \pm 0.22 ^a	17.5 \pm 1.5 ^a	47.5 \pm 24 ^a	11.3 \pm 1 ^a	1.5 \pm 0.5 ^a
Stepholidine ^c	5.9	974	30 (Rat)	3748	4.4
 5	183 \pm 27.5 ^b	320 \pm 159 ^a	251 \pm 56 ^b	2565 \pm 1673 ^a	185 \pm 97 ^b
 6	136 \pm 42 ^a	486 \pm 106 ^b	306.5 \pm 61.5 ^b	5092 \pm 1589 ^b	41.1 \pm 24.3 ^a
 7	1727 \pm 238 ^a	>10,000	>10,000	>10,000	1508 \pm 136 ^b
 8	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000
Dihydropyridine ^c	35.7	2607	170 (Rat)	13 (Rat)	16 (Rat)

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Compounds	Affinity for D ₁ , nM (K _i ± SEM)	Affinity for D _{2L} , nM (K _i ± SEM)	Affinity for D ₃ , nM (K _i ± SEM)	Affinity for D ₄ , nM (K _i ± SEM)	Affinity for D ₅ , nM (K _i ± SEM)
 9	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000
 10	1264 ± 165.5 ^b	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000
 11	2070 ± 76 ^a	>10,000	>10,000	>10,000	1810 ± 478 ^a
 12a	4748 ± 500 ^a	>10,000	>10,000	>10,000	1812 ± 164 ^b
 12b	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000
 17	3019 ± 817 ^b	2724 ± 411 ^b	>10,000	>10,000	>10,000
 18	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000
 19	2349 ± 1414 ^b	7371 ± 2018 ^b	>10,000	6644 ± 2547 ^b	>10,000

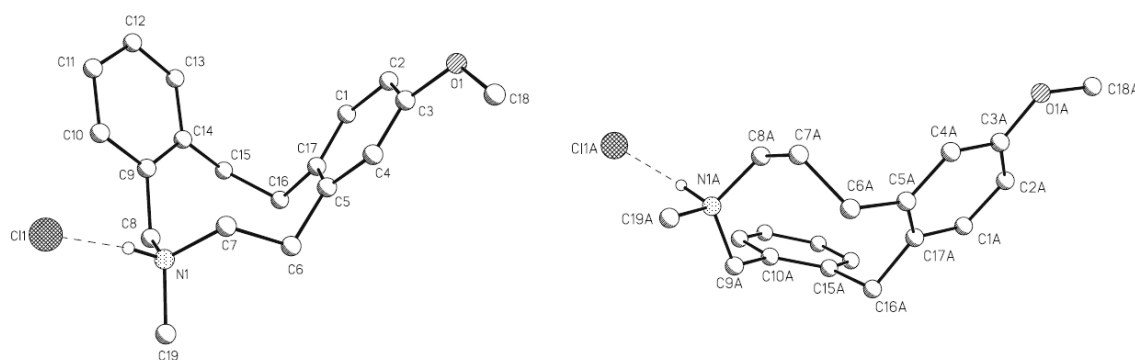


Figure 3. X-ray structures of dibenzo[c,g]azecine **7** and dibenzo[c,f]azecine **10**.

receptor affinities recognized for the other dibenzazecines, ring opening to the corresponding dibenzo[c,g]azecines **7**, **8** abolishes affinities. In this case, the dibenzo[c,g]quinolizines are more prone to interact with the receptor than the more flexible dibenzo[c,g]azecines. Thus, higher flexibility and moderate increase in residual mobility are not always beneficial for receptor interaction.

Contrary to dibenzo[d,g]azecines, whose hydroxy derivative **4** has distinctly higher affinities than the methoxy congener **3**, the methoxy derivatives of dibenzo[c,g]- and -[c,f]azecines (**7** and **10**) unexpectedly display higher affinities. All investigated dibenzazecines show an explicit selectivity toward the D₁-receptor family. Our findings might contribute to essential insights for further molecular modeling studies on this topic.

5. Experimental

5.1. Synthesis and characterization of test compounds

Syntheses were performed under nitrogen with solvents and reagents of commercial availability with no further purification. Melting points are uncorrected and were measured in open capillary tubes, using a Gallenkamp melting point apparatus. ¹H and ¹³C NMR spectral data were obtained from a Bruker Avance 250 spectrometer (250 MHz) and Avance 400 spectrometer (400 MHz), respectively. Elemental analyses were performed on a Hereaus Vario EL apparatus for all test compounds. MS data were determined by GC–MS, using a Hewlett–Packard GCD-Plus (G1800C) apparatus (HP-5MS column; J&W Scientific). EI–MS–Spectra were recorded using LCQ Advantage by ThermoElectron and HRMS were recorded by a TSQ Quantum AM spectrometer (Thermo Electron Corporation (Waltham, USA)).

5.1.1. Ring opening—general procedure

A 100-mL three-neck flask equipped with a balloon as an overflow tank was cooled in a liquid nitrogen bath. Ammonia was condensed into this flask until it was 3/4 filled. The cooling bath was removed and the ammonia was allowed to liquefy. After suspending 1 mmol of the quaternary salts (**13**, **16**) in the liquid ammonia, rice-grain-sized pieces of sodium were added to the stirred mixture until the developing blue color remained for 10–15 min. The mixture was quenched with 1–2 drops of saturated aqueous NH₄Cl. The ammonia was evaporated under nitrogen. The residue was portioned between ether and water and was stirred until two phases formed. The aqueous phase was extracted with ether (3 × 15 mL) and the pooled organic phases were dried over MgSO₄ and evaporated to yield the ring open compound (e.g., **7**, **10**). In case of dibenzo[c,g]azecines also tetrahydroisoquinoline derivatives (**17**, **19**) were obtained as by-products.

5.1.2. Synthesis of the quaternary salts (e.g., **13** and **16**)—general procedure

A 10-fold molar excess of methyl iodide was added to a stirred solution of the respective quinolizine (e.g., **5**, **9**) in acetonitrile. Under nitrogen, the mixture was stirred for 48 h at room temperature. The precipitated solids were isolated by filtration, washed with little acetonitrile and dried in vacuo.

5.1.3. Ether cleavage of methoxylated compounds (**5**, **10**, and **13**)—general procedure

The methoxy compound was dissolved in a mixture of 20 mL of glacial acetic acid and 10 mL aqueous HBr (48%) and refluxed under nitrogen for 5 h. The solvents were removed in vacuo and the residue was crystallized from methanol/diethyl ether. Hydroxy compound **11** was obtained from the methoxy congener **10** by cleavage with a fivefold molar excess of BBr₃ in CHCl₃.

5.1.4. 3-Methoxy-5,8,13,13a-tetrahydro-6H-isoquino[3,2-a]isoquinoline (**5**)

A solution of 3-methoxyphenethylamine (0.02 mol) and 3-isochromanone (0.022 mol) in toluene (100 mL) was refluxed under nitrogen for 6 h. After cooling down to room temperature, the amide can be filtered off as white-yellow solid. The amide (0.005 mol) was dissolved in a mixture of 40 mL acetonitrile and 5 mL POCl₃. The solution was refluxed for 18 h. The solvents were removed in vacuo and the resulting brown oil washed twice with 20 mL of petroleum ether. The residue was dissolved in 40 mL methanol and cooled to 0 °C in an ice bath. NaBH₄ (6 g) was added in small portions to the cooled reaction mixture. The cooling was removed and the suspension refluxed for 0.5 h. After evaporation of the solvent, the residue was dissolved in water and extracted with ethyl acetate. The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated in vacuo. The resulting yellow oil was crystallized from methanol to yield 62% of a yellow powder. Mp: 224 °C (hydrochloride), ¹H NMR: 250 MHz (CDCl₃): δ 2.59–3.42 (m, 6H); 3.59–3.86 (m, 2H); 3.82 (s, 3H, OMe); 4.03–4.08 (d, *J* = 14.95 Hz, 1H) 6.69–6.70 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, 4); 6.80–6.84 (dd, *J* = 2.4, 8.6 Hz, 1H, 2); 7.09–7.21 (m, 5H, 1, 9, 10, 11, 12); ¹³C NMR: 250 MHz (DMSO-*d*₆): δ 29.77; 36.81; 51.31; 55.23; 58.60; 59.49; 76.56; 77.07; 77.58; 112.50; 113.18; 125.82; 126.14; 126.26; 126.56; 128.74; 130.27; 134.45; 134.49; 135.83; 157.82 GC–MS: *m/z* 264 (100%); 250 (11%); 234 (2%); 218 (6%); 204 (2%); 191 (2%); 178 (2%); 167 (1%); 160 (82%); 147 (10%); 139 (1%); 130 (4%); 117 (13%); 104 (54%); 91 (9%); 78 (18%); 65 (4%). Anal. (C₁₈H₁₉NO): C, H, N.

5.1.5. 5,8,13,13a-Tetrahydro-6H-isoquino[3,2-a]isoquinolin-3-ol hydrobromide (**6**)

The synthesis was performed according to the general procedures in the manuscript from 0.4 g of the methyl-ether **5**. Recrystal-

lization from methanol/diethyl ether yielded 23% brown powder. Mp: 245 °C. ^1H NMR: 250 MHz (DMSO- d_6): δ 2.97–3.91 (m, 6H); 4.52–4.74 (m, 2H); 4.76–4.92 (m, 1H, 13a); 6.63–6.64 (d, J = 2.1 Hz, 1H, 4); 6.74–6.78 (dd, J = 1.9, 8.2 Hz, 1H, 2); 7.25–7.32 (m, 5H, 1, 9, 10, 11, 12); 10.52 (s, 1H, OH); ^{13}C NMR, dept: 250 MHz (DMSO- d_6): δ 23.97; 33.21; 50.45; 54.88; 59.56 (13a); 115.05; 115.19; 122.86; 126.51; 127.26; 127.35; 128.27; 128.84; 129.24; 132.15; 133.23; 157.22. Anal. ($\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{BrNO} \times 1/8 \text{ HBr}$): C, H, N.

5.1.6. 10-Methoxy-6-methyl-5,6,7,8,13,14-hexahydrodibenzo[cg]azecine hydrochloride (7)

The synthesis was performed according to the general procedures in the manuscript using 0.7 g of **13**. Flash chromatography on silica gel with methanol/chloroform (1:4) as eluent, gave a yellow oil. Addition of two drops of ethereal HCl and recrystallization from 2-propanol/diethyl ether yielded 9.7% of white crystals. Mp: 214 °C. ^1H NMR: 250 MHz (methanol- d_4): δ 2.80–2.94 (m, 1H, 4); 3.08–3.51 (m, 8H, 7, 8, 13, 14); 3.85–3.97 (m, 1H, 5); 4.42–4.48 (dd, J = 4.4, 10.7 Hz, 1H, 5); 5.95–5.99 (d, J = 8.4 Hz, 1H, 9); 6.35–6.39 (dd, J = 2.5, 8.4 Hz, 1H, 11); 6.68–6.69 (d, J = 2.3 Hz, 1H, 12); 7.10–7.22 (m, 4H, 1, 2, 3, 4). HRMS m/z calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{NO}$ 282.1852 found 282.1850; EI-MS m/z : 281 (100%); 266 (12%); 250 (23%); 235 (13%); 223 (51%); 208 (17%); 192 (7%); 176 (56%); 165 (9%); 159 (7%); 146 (35%); 134 (23%); 115 (11%); 104 (18%); 91 (19%); 78 (10%); 65 (5%); 57 (9%); 44 (29%); 36 (17%); GC-MS: (base) m/z : 281 (3%); 266 (3%); 250 (5%); 235 (3%); 219 (2%); 176 (10%); 162 (8%); 144 (30%); 130 (11%); 118 (20%); 104 (100%); 91 (40%); 78 (80%); 65 (20%). Anal. ($\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{ClNO} \times 1/9 \text{ HCl}$) C, N; for H calcd 7.55, found 6.92.

5.1.7. 6-Methyl-5,6,7,8,13,14-hexahydrodibenzo[cg]azecine-10-ol hydrochloride (8)

The synthesis was performed according to the general procedures in the manuscript from 0.05 g of the methyl-ether **7**. The crude product was dissolved in a small amount of acetone. After adding two drops of ethereal HCl and some drops of ether, brown oil separates, which could be dried in vacuo to a brown powder. Mp: 198 °C. Yield 14.1%. ^1H NMR: 250 MHz (methanol- d_4): δ 2.78–2.91 (m, 1H, 7); 2.99–3.09 (m, 7H, 13, 14, N-Me); 3.30–3.34 (m, 2H, 8); 3.50–3.60 (m, 1H, 7); 4.43–4.58 (q, J = 14.0 Hz, 2H, 5); 6.53–6.60 (m, 2H, 9, 11); 7.01–7.04 (d, J = 8.2 Hz, 1H, 12); 7.20–7.26 (m, 3H, 1, 2, 3); 7.42–7.49 (d, J = 8.1 Hz, 4) ^{13}C NMR, dept: 250 MHz (methanol- d_4): δ 25.14; 31.74; 32.13; 42.82 (N-Me); 54.42; 55.66; 114.31; 115.46; 126.65; 127.74; 128.47; 128.66; 129.79; 130.55; 131.52; 132.29; 136.19; 142.02; 155.89. GC-MS: (base) m/z : 267 (2%); 252 (2%); 236 (2%); 223 (1%); 210 (2%); 146 (14%); 132 (2%); 120 (20%); 104 (30%); 91 (28%); 78 (33%); 65 (15%); 52 (18%); 44 (100%). Anal. ($\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{ClNO} \times 4/5 \text{ H}_2\text{O} \times 1/5 \text{ HCl}$) C, H, N.

5.1.8. 3-Methoxy-6,7,9,13b-tetrahydro-5H-isoindolo[1,2-a][2]benzazepine (9)

To a suspension of 5.0 g (0.13 mol) lithium aluminum hydride in 150 mL of dry THF there was added slowly under nitrogen and with cooling a solution of 5.0 g (0.18 mol) of the lactam **13** in 50 mL of dry THF. The mixture was refluxed for 1 h and stirred overnight. With cooling, the residual lithium aluminum hydride was decomposed by the careful addition of a saturated aqueous solution of potassium-sodium tartrate. After filtration of inorganic solids and washing of the filter cake with 50 mL of THF, the layers were separated and the aqueous layer was extracted with dichloromethane. After evaporation of the pooled organic extracts, the residue was dissolved in 50 mL of dichloromethane and dried over Na_2SO_4 . Evaporation of the solvent yielded 2.2 g of **9** as yellow oil that slowly solidified after storage in the refrigerator. Work

up from the lithium aluminum hydride reduction was accomplished as free base. Either strongly alkaline or acidic conditions should be avoided. This isoindole-derivative is very unstable and attempts to convert it into an HCl-salt failed due the immediate formation of a dark green solution and no solids. The free base forms yellow oil which solidifies to a brick red solid upon storage in the refrigerator. Mp: 68–70 °C. Due to the instability, the pure compound shows three decomposition compounds in the GC-MS. The fragmentation of the amine is characteristic for quinolizine-like compounds and has a $m-1$ peak as the most stable fragment: m/z : 265 (34%); 264 (100%); 248 (32%); 236 (9%); 220 (8%); 204 (5%); 191 (6%); 156 (6%); 144 (13%); 131 (14%). ^1H NMR 250 MHz (CDCl_3): δ 1.75–1.98 (m, 2H, 6); 2.74–3.40 (m, split in four separate signals, each matching 1H, 4H, 5, and 6); 3.83 (s, 3H, O-Me); 3.79–3.88 (d, J = 13 Hz, 1H, 8); 4.39–4.44 (d, J = 13 Hz, 1H, 8); 5.70 (s, 1H, 13b); 6.62–6.67 (dd, J = 2.6, 8.5 Hz, 1H, 2); 6.77–6.78 (d, J = 2.6, 1H, 4); 7.17–7.20 (d, J = 8.5 Hz, 1H, 1); 7.25–7.30 (m, 4H, 9, 10, 11, 12). Anal. ($\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO} \times \text{H}_2\text{O}$): C, H, N.

5.1.9. 11-Methoxy-6-methyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo[c]azecine (10)

According the general procedure in the manuscript, 1.7 mmol (700 mg) of the mossy green crude quaternary salt **16** were ring opened with sodium in liq. ammonia. The amber colored oily residue was dissolved in 1 mL of 2-propanol and converted into an HCl-salt by the addition of three drops concd HCl acid. The greenish precipitation was recrystallized from acetone/2-propanol to give 300 mg of white needles with mp 208–210 °C. Yield: 55% after recrystallization. ^1H NMR 250 MHz (methanol- d_4): (HCl-salt) δ 1.9–2.2 (m, 1H, 5, 6 or 7); 2.4–3.0 (m, 4H, 5, 6 or 7); 3.09 (s, 3H, N-Me); 3.09–3.28 (m, 1H, 5, 6 or 7); 3.74 (s, 3H, O-Me); 3.91–3.97 (d, J = 15 Hz, 1H, 14); 4.21–4.27 (d, J = 15 Hz, 1H, 14); 4.41–4.46 (d, J = 13 Hz, 1H, 9); 4.76–4.80 (d, J = 13 Hz, 1H, 9); 6.72 (d, J = 2.5 Hz, 1H, 4); 6.79–6.81 (dd, J = 2.5, 8.5 Hz 1H, 2); 7.29–7.51 (m, 4H, 10, 11, 12, 1); 7.51–7.77 (dd, J = 8.0/1.0 Hz, 1H, 13). GC-MS: (base) m/z : 281 (37%); 266 (5%); 249 (10%); 235 (7%); 223 (19%); 209 (100%); 190 (84%); 177 (35%); 165 (32%); 152 (9%); 145 (21%); 115 (14%). Anal. ($\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO} \times \text{HCl}$): C, H, N.

5.1.10. 6-Methyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo[c]azecine-11-ol (11)

An aqueous solution of 317 mg **10** HCl (1 mmol) was alkalinized with some NaOH and extracted with CHCl_3 . After drying over MgSO_4 , the solvent was evaporated to approximately 50 mL. With an external cooling bath and under nitrogen atmosphere, 450 μL of BBr_3 (~5 mmol) were added through a septum. The cooling bath was removed and the reaction mixture was brought to reflux for 1 h. When the mixture returned to room temperature, it was poured onto chipped ice and the pH was brought to 9 with 2 N NaOH. Extraction with CH_2Cl_2 , drying over MgSO_4 and evaporation yielded 151 mg of white foam. Yield 56%. Mp: 139–140 °C. ^1H NMR: 250 MHz (CDCl_3): (base): δ 1.48–1.51 (mc, 4H, 6, 10); 2.03–2.07 (mc, 4H, 7, 9); 2.17 (s, 3H, N-Me); 2.65–2.75 (mc, 4H, 5, 11); 4.06 (s, 2H, 16); 6.47–6.52 (dd, J = 2.6, 8.2, 1H, 2); 6.61 (d, J = 2.6, 1H, 4); 6.86–6.90 (d, J = 8.2, 1H, 1); 7.01–7.14 (m, 4H, 12, 13, 14, 15). GC-MS: (base) m/z : 267 (3%); 252 (2%); 236 (5%); 221 (3%); 209 (12%); 195 (39%); 176 (18%); 165 (45%); 152 (30%); 146 (30%); 132 (35%); 120 (46%); 115 (52%); 107 (48%); 104 (72%); 102 (71%); 91 (100%); 70 (100%); 57 (92%). Anal. ($\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO} \times 1/5 \text{ H}_2\text{O}$): C, H, N.

5.1.11. 3-Methoxy-7-methyl-5,8,13,13a-tetrahydro-6H-isoquino[3,2-a]isoquinolinium iodide (13)

The synthesis was performed according to the general procedures in the manuscript using 2 g of **5**. The precipitate was filtered and washed with little ether to yield 96% of white crystals. Mp:

199 °C; ^1H NMR: 250 MHz (DMSO- d_6): δ 2.82 (s, 3H, N-Me); 2.98–3.45 (m, 3H); 3.78 (s, 3H, MeO); 3.82–4.16 (m, 3H); 4.76–4.98 (dd, J = 15.5, 39.75 Hz, 2H, 10); 5.15–5.22 (dd, J = 4.4, 12.5 Hz, 1H, 13a); 6.87–6.99 (m, 2H); 7.28–7.45 (m, 5H); ^{13}C NMR: 250 MHz (DMSO- d_6): δ 23.78; 28.96; 33.81; 55.76; 60.57; 64.70; 65.47; 113.77; 114.35; 122.58; 126.88; 127.25; 127.76; 128.51; 128.77; 130.16; 131.02; 132.39, 159.66. Anal. ($\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{INO}$): C, H, N.

5.1.12. 3-Hydroxy-7-methyl-5,8,13a-tetrahydro-6H-isoquinoline-6-ol [3,2-a]isoquinolinium bromide (14)

The synthesis was performed according to the general procedures in the manuscript from 1 g of **13**. Recrystallization from methanol yielded 43% of a brown powder. Mp: 274 °C; ^1H NMR: 250 MHz (DMSO- d_6): δ 2.80 (s, 3H, N-Me); 2.96–3.41 (m, 2H); 3.84–4.07 (m, 4H); 4.70–4.49 (dd, J = 15.5, 39.75 Hz, 2H, 10); 5.08–5.14 (dd, J = 4.4, 12.5 Hz, 1H, 13a); 6.69 (d, J = 1.8 Hz, 1H, 4); 6.76–6.80 (dd, J = 1.9, 10.7 Hz, 1H, 2); 7.26–7.38 (m, 5H, 1, 9, 10, 11, 12); 9.71 (s, 1H, OH); ^{13}C NMR, dept: 250 MHz (DMSO- d_6): δ 23.61; 28.99; 38.79 (N-Me); 60.62; 64.64; 65.50 (13a); 115.33; 115.44; 120.88; 127.18; 127.24; 127.74; 127.75; 128.66; 129.48; 130.90; 132.15; 157.72. Anal. ($\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{BrNO} \times 1/11 \text{ HBr}$): C, H, N.

5.1.13. 3-Methoxy-5,6,7,13b-tetrahydro-9H-isoindolo[1,2-a][2]benzazepin-9-one (15)

According to the general procedure, described by Heaney and Shuhaibar⁹, a mixture of 12.5 g (75.5 mmol) methyl-2-formylbenzoate and 12.35 g (75.5 mmol) of 3-(3-methoxyphenyl)-propylamine in 80 mL of toluene was refluxed for 4 h under Dean–Stark conditions. After evaporation of the solvent and recrystallization from ethyl acetate, 14 g of the imine were obtained as off-white powder with >99% GC–MS purity. Yield: 60%. GC–MS: 311 (1%); 296 (6%); 177 (100%); 145 (62%); 132 (25%); 121 (20%); 91 (16%). For the rearrangement, a pea-sized piece of metallic sodium was added to a solution of 1.5 g (4.8 mmol) of the imine in 50 mL of methanol and the mixture was stirred under an inert atmosphere for 2 days. After removal of the solvent, the residue was dissolved in dichloromethane and washed with water to yield after drying over Na_2SO_4 and evaporation of the solvent 1.2 g of a methoxy-isoindolone as oil. (Yield: 80%). ^1H NMR: (CDCl_3) δ 1.90–1.99 (m, 2H, 9); 2.57–2.63 (t, J = 8.6 Hz, 2H, 10); 2.79 (s, 3H, 1-OMe); 3.18–3.29 (m, 1H, 8); 3.70 (s, 3H, 12-OMe); 3.73–3.82 (m, 1H, 8); 5.78 (s, 1H, 1); 6.62–6.73 (m, 3H, 11, 13, 15); 7.07–7.11 (t, J = 7.8 Hz, 1H, 14); 7.44–7.48 (m, 3H, 3, 4, 5); 7.73–7.77 (m, 1H, 2). GC–MS: 311 (38%); 297 (18%); 296 (88%); 188 (10%); 147 (100%); 133 (21%); 121 (32%); 91 (32%). For the acyliminium cyclization, 3.0 g (9.6 mmol) of the methoxy-isoindolone were dissolved in 50 mL of dichloromethane. The solution was cooled to –78 °C in a dry-ice/methanol bath under an inert atmosphere and 1.2 mL (9.6 mmol) of TiCl_4 were added through a septum. The solution was stirred in the ice bath and allowed to return to room temperature overnight. The reaction mixture was washed with satd solution of sodium hydrogen carbonate, the phases were separated, the organic layer dried over Na_2SO_4 and evaporated to leave the lactam as an oil which was purified by column chromatography ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) 9:1. Yield: 83%. ^1H NMR: 400 MHz (CDCl_3): δ 1.95–2.25 (mc, 2H, 6); 2.70–2.80 (mc, 2H, 5); 3.32–3.40 (mc, 2H, 7); 3.80 (s, 3H, OMe); 4.34–4.39 (mc, 2H, 7); 5.71 (s, 1H, 13b); 8.60 (s, 1H, 4); 6.73–6.76 (d, 1H, J = 7.5, 2) 7.17–7.20 (d, J = 7.5, 1H, 1); 7.46–7.58 (m, 3H, 10, 11, 12); 7.90–7.92 (d, J = 7.5, 13). GC–MS m/z : 279 (100%); 279 (87%); 264 (4%); 250 (53%); 220 (30%); 178 (11%); 165 (10%); 147 (14%) 130 (11%); 102 (6%).

5.1.14. 3-Methoxy-8-methyl-6,7,9,13b-tetrahydro-5H-isoindolo[1,2-a][2]benzazepinium iodide (16)

The solution of 2 g of compound **9** in acetonitrile and an excess of methyl iodide turns deeply green. After evaporation of the sol-

vents, crude **16** was obtained as dark green oil. Attempts to induce crystallization from methanol/diethyl ether failed but the ether insoluble oil popped up under reduced pressure to mossy green foam which was successfully used for the ring opening procedure without further purification. Yield 72%.

5.1.15. 2-Methyl-1-(2-methylbenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-6-ol hydrochloride (17)

The synthesis was performed according to the general procedures in the manuscript using 0.5 g of **14**. Removing of ether in vacuo yielded white foam. Addition of two drops of etheric HCl and recrystallization from 2-propanol/diethyl ether yielded 53% of white crystals. Mp: 224 °C; ^1H NMR: 250 MHz (methanol- d_4): δ 1.95 (s, 3H, 2'-Me); 2.98 (s, 3H, N-Me); 3.08–3.51 (m, 5H); 3.85–3.97 (m, 1H); 4.42–4.48 (dd, J = 4.4, 10.7 Hz, 1H); 5.95–5.99 (d, J = 8.4 Hz, 1H, 8); 6.35–6.39 (dd, J = 2.5, 8.4 Hz, 1H, 7); 6.68–6.69 (d, J = 2.3 Hz, 1H, 5); 7.13–7.20 (m, 4H, 3', 4', 5', 6'); ^{13}C NMR, dept: 250 MHz (methanol- d_4): δ 17.94 (2'-Me); 22.29; 36.13; 39.40; 44.90 (N-Me); 64.21; 113.36; 114.61; 120.04; 125.89; 127.15; 129.40; 130.17; 130.51; 130.88; 133.43; 137.21; 157.56. EI-MS m/z : 162 (100%); 147 (10%); 117 (2%); 105 (9%); 77 (5%); 65 (2%); 42 (11%); 36 (8%). Anal. ($\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{ClNO} \times 1/11 \text{ HCl}$) C, H, N.

5.1.16. 3-(2-Ethyl-4-methoxyphenyl)-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinoline hydrochloride (18)

To a solution of 0.48 g (1.18 mmol) quaternary salt **11** in 20 mL methanol, 1 g of freshly prepared silver oxide was added and the mixture refluxed for 20 min. The suspension was cooled to room temperature, filtered and the solution treated with charcoal for 10 min at room temperature. After filtration the solvent was removed in vacuo. The residue was dissolved in 5 mL of DMSO and allowed to stand at room temperature for 15 min. Ice water (2.5 mL) was added, and the solution extracted with benzene. The organic layer was dried over potassium carbonate, passed through a column of alumina, and eluted with 100 mL of benzene to yield 208 mg of yellow oil, which was crystallized from acetone to obtain 125 mg of white crystals. The solid was dissolved in 20 mL of dioxane and stirred with platinum oxide in hydrogen atmosphere (balloon) at room temperature for 5 h. After filtration, the solvent was removed in vacuo. The resulting yellow oil crystallized after addition of two drops etheric HCl from 2-propanol/diethyl ether. Yield 15%. Mp: 229 °C; ^1H NMR: 250 MHz (methanol- d_4): δ 1.21–1.27 (t, J = 7.5 Hz, 3H, $\text{Ph-CH}_2\text{-CH}_3$); 2.70 (s, 3H, NMe); 2.61–2.93 (m, 2H, $\text{Ph-CH}_2\text{-CH}_3$); 3.24–3.65 (m, 2H); 3.84 (s, 3H, MeO); 4.65–4.92 (m, 3H); 6.74–6.99 (m, 2H); 7.28–7.33 (m, 4H); 7.51–7.59 (d; J = 8.5 Hz, 1H); ^{13}C NMR, dept: 250 MHz (methanol- d_4): δ 14.99 ($\text{Ph-CH}_2\text{-CH}_3$), 25.61; 35.03; 39.23 (N-Me); 54.47 (MeO); 56.52; 61.29 (3); 112.76; 114.78; 124.10; 125.91; 127.00; 127.86; 127.90; 127.96; 128.20; 131.69; 145.29; 160.65. GC–MS: (base) m/z : 281 (5%); 266 (3%); 250 (8%); 235 (5%); 219 (4%); 204 (2%); 191 (2%); 176 (20%); 162 (16%); 146 (58%); 132 (18%); 118 (23%); 104 (100%); 91 (44%); 78 (68%); 65 (19%). Anal. ($\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{ClNO}$) C, H, N.

5.1.17. 6-Methoxy-2-methyl-1-(2-methylbenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline hydrochloride (19)

The synthesis was performed according to the general procedures in the manuscript using 0.7 g of **13**. Silica gel column with methanol/chloroform (1:4) as eluent yielded a yellow oil. Addition of two drops of etheric HCl and crystallization from 2-propanol/diethyl ether yielded 60% of white crystals. Mp: 192 °C; ^1H NMR: 250 MHz (methanol- d_4): δ 1.95 (s, 3H, 2'-Me); 3.00 (s, 3H, N-Me); 3.10–3.51 (m, 5H); 3.76 (s, 3H, MeO); 3.89–4.00 (m, 1H); 4.48–4.54 (dd, J = 4.3, 10.7 Hz, 1H, 1); 6.06–6.10 (d, J = 8.6 Hz, 1H, 8); 6.49–6.54 (dd, J = 2.4, 8.6 Hz, 1H, 7); 6.84–6.85 (d, J = 2.5 Hz, 1H, 5); 7.10–7.19 (m, 4H, 3', 4', 5', 6'); ^{13}C NMR, dept: 250 MHz (metha-

mol-d₄): δ 19.38 (2'-Me); 22.01; 38.42; 40.10; 44.32 (N-Me); 55.28 (MeO); 64.32; 112.66; 113.54; 120.68; 126.15; 127.45; 129.97; 130.11; 130.48; 131.14; 133.43; 137.14; 159.70. GC-MS *m/z*: 176 (100%); 161 (23%); 144 (6%); 132 (54%); 117 (9%); 105 (91%); 91 (11%); 77 (70%); 65 (17%). Anal. (C₁₉H₂₄ClNO) C, H, N.

5.2. X-ray analyses of compounds 7 and 10

The intensity data for the compounds were collected on a Nonius KappaCCD diffractometer using graphite-monochromated Mo K α radiation. Data were corrected for Lorentz and polarization effects but not for absorption effects.^{13,14}

The structures were solved by direct methods (SHELXS¹⁵) and refined by full-matrix least squares techniques against F_o^2 (SHELXL-97¹⁶). For the whole compound 7 and for the amine-groups of 10 the hydrogen atoms were located by difference Fourier synthesis and refined isotropically. The other hydrogen atom positions were included at calculated positions with fixed thermal parameters. Compound 10 crystallized as a racemic twin. All non-hydrogen atoms were refined anisotropically.¹⁶ XP (SIEMENS Analytical X-ray Instruments, Inc.) was used for structure representations.

5.2.1. Crystal data for 7

C₁₉H₂₄ClNO, *M_r* = 317.84 g mol⁻¹, colorless prism, size 0.04 × 0.04 × 0.04 mm³, monoclinic, space group *P*2₁/c, *a* = 14.4129(5), *b* = 11.1844(6), *c* = 11.4434(6) Å, β = 108.873(2)°, *V* = 1745.50(14) Å³, *T* = -90 °C, *Z* = 4, ρ_{calcd} = 1.209 g cm⁻³, μ (Mo K α) = 2.21 cm⁻¹, *F*(0 0 0) = 680, 12,180 reflections in $h(-18/18)$, $k(-14/12)$, $l(-14/14)$, measured in the range 2.62° ≤ θ ≤ 27.46°, completeness Θ_{max} = 99.7%, 3987 independent reflections, *R*_{int} = 0.0569, 2797 reflections with *F_o* > 4σ(*F_o*), 295 parameters, 0 restraints, *R*_{1obs} = 0.0433, *wR*_{2obs} = 0.0886, *R*_{1all} = 0.0775, *wR*_{2all} = 0.1024, GOOF = 1.010, largest difference peak and hole: 0.186/−0.229 e Å⁻³.

5.2.2. Crystal data for 10

C₁₉H₂₅ClNO_{1.50}, *M_r* = 326.85 g mol⁻¹, colorless prism, size 0.04 × 0.04 × 0.04 mm³, triclinic, space group *P*1, *a* = 7.1171(3), *b* = 14.7356(6), *c* = 17.1663(8) Å, α = 103.813(2)°, β = 95.077(3)°, γ = 90.005(3)°, *V* = 1740.97(13) Å³, *T* = -90 °C, *Z* = 4, ρ_{calcd} = 1.247 g cm⁻³, μ (Mo K α) = 2.25 cm⁻¹, *F*(0 0 0) = 700, 12,481 reflections in $h(-9/8)$, $k(-19/19)$, $l(-21/22)$, measured in the range 2.09° ≤ θ ≤ 27.50°, completeness Θ_{max} = 98%, 12,481 independent reflections, *R*_{int} = 0.0000, 9649 reflections with *F_o* > 4σ(*F_o*), 826 parameters, three restraints, *R*_{1obs} = 0.0596, *wR*_{2obs} = 0.1270, *R*_{1all} = 0.0905, *wR*_{2all} = 0.1453, GOOF = 1.039, Flack-parameter 0.47(6) (racemic twin), largest difference peak and hole: 0.395/−0.438 e Å⁻³.

5.3. Pharmacological assays

5.3.1. Dopamine receptor affinity

5.3.1.1. Cell culture. Human D₁, D_{2L}, D₃, D_{4,4}, and D₅ receptors were stably expressed in Chinese hamster ovary (CHO) cells or human embryonic kidney cells (HEK293). D₁, D_{2L}, D₃, and D₅ were expressed in HEK cells and D_{4,4} receptors were expressed in CHO cells, respectively. Cells were grown at 37 °C under an atmosphere of 5% CO₂: 95% air in HAM/F12-medium (Sigma–Aldrich) for CHO cells and Dulbecco's modified Eagles Medium Nutrient mixture F-12 Ham for HEK293 cells, each supplemented with 10% fetal bovine serum, 1 mM L-glutamine and 0.2 µg/mL of G 418 (all from Sigma–Aldrich).

5.3.1.2. Preparation of whole-cell-suspension¹⁷. Human D₁, D_{2L}, D₃, D₄, and D₅ receptor cell lines were grown on T 175 culture dishes (Greiner bio-one, Frickenhausen) to 85% confluence. The medium was removed and the cells were incubated with 3 mL

trypsin–EDTA-solution (Sigma–Aldrich) to remove the cells from the culture dish. After incubation, cells were suspended in 6 mL medium in order to stop the effect of trypsin–EDTA-solution. The resulting suspension was centrifuged (483 RCF, 4 °C, 4 min). The pellet was re-suspended in 20 mL of ice-cooled PBS (phosphate-buffered saline: 137 mM NaCl, 2.7 mM, 8.1 mM Na₂HPO₄ and 1.4 mM KH₂PO₄) and again centrifuged to obtain a pellet. This procedure was repeated once before the resulting pellet was suspended in 12 mL of buffer (5 mM magnesium chloride, 50 mM TRIS–HCl, pH 7.4). This resulting suspension was directly used for the radioligand binding assay.

5.3.1.3. Radioligand binding assay. The binding studies were performed following the protocol previously described but in 96-well format.³ The assays with the whole-cell-suspension were carried out in triplicate in a volume of 550 µL (final concentration): TRIS–Mg²⁺-buffer (345 µL), [³H]-ligand (50 µL), whole-cell-suspension (100 µL) and appropriate drugs (55 µL). As radioligands, for the D₁ family (D₁ and D₅) [³H] SCH23390, and for the D₂ family (D₂, D₃, D₄) [³H] spiperone were used. Non-specific binding was determined using fluphenazine (100 µM) for D₁ and D₅ tests and haloperidol (10 µM) for D₂, D₃, and D₄ tests. The incubation was initiated by addition of the radioligand and was carried out in 96 deep well plates (Greiner bio-one, Frickenhausen) using a thermocycler (Thermocycler comfort®, Eppendorf, Wessling) at 27 °C. The incubation was terminated after 90 min by rapid filtration with a Perkin–Elmer Mach III Harvester™ using a Perkin–Elmer Filtermat A, previously treated with a 0.25% polyethyleneimine-solution (Sigma–Aldrich) and washed with water. The filtermat was dried for 3 min at 400 W using a microwave oven (MW 21, Clatronic, Kempen). The dry filtermat was placed in a filter plate (Omni filter plates™, Perkin–Elmer Life Sciences) and each field of the filtermat moistened with 50 µL Microscint 20™ scintillation cocktail. The radioactivity retained on the filters was counted using a Top Count NXT™ microplate scintillation counter (Packard, CT, USA). For determining the *K_i* values at least two independent experiments each in triplicate were performed.

The competition binding data were analyzed with GraphPad Prism™ software using nonlinear regression with sigmoidal dose response equation. For calculating of mean, standard deviation and standard error of the mean the software Microsoft Excel™ was used. *K_i* values were calculated from IC₅₀ values applying the equation of Cheng and Prusoff.¹⁸

5.3.2. Functional assay: measuring intracellular Ca²⁺ with a fluorescence microplate reader^{3,19}

5.3.2.1. Cell culture. Human D₁ and D_{2L} receptors were stably expressed in human embryonic kidney cells (HEK293) and cultured as mentioned above.

5.3.2.2. Preparation of whole-cell-suspension. Human D₁ and D_{2L} receptor cell lines were grown on T 175 culture dishes (Greiner bio-one, Frickenhausen) to 85–90% confluence. The medium was removed via a suction apparatus and cells rinsed twice with 6 mL Krebs-HEPES buffer (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 4.2 mM NaHCO₃, 11.7 mM D-glucose, 1.3 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.4) each time. After these two washes, cells were loaded with 3 µL of a 0.5 M Oregon Green™ 488 BAPTA-1/AM-solution (Molecular Probes, Eugene, OR) (in DMSO) in 6 mL of Krebs-HEPES buffer containing 3 µL of a 20% Pluronic F-127-solution (Sigma–Aldrich) (in DMSO) for 45 min at 37 °C. After 35 min incubation, the culture dish was rapped slightly in order to remove all cells from the dish for further incubation. To this cell suspension 5 mL of Krebs-HEPES buffer were added again to rinse all cells from the plate. Then the resulting suspension portioned in 10 1.5 mL Eppendorf caps and centrifuged at 10,640 RCF for 10 s.

The supernatant buffer was removed and the resulting 10 pellets are divided in two portions of five pellets, which are suspended, in 1 mL of Krebs-HEPES buffer, each. The two suspensions are centrifuged again for 10 s. After removing the buffer, the two pellets were combined and re-suspended in 1 mL buffer, diluted with 17 mL of Krebs-HEPES buffer and plated into 96-well plates (Opti-Plate HTRF-96[®], Packard, Meriden, CT; Cellstar, Tissue Culture Plate, 96 W, Greiner bio-one, Frickenhausen). Microplates were kept at 37 °C under an atmosphere including 5% CO₂ for 30 min before they were used for the assay.

5.3.2.3. Calcium assay³. Screening for agonistic and antagonistic activity was performed using a NOVostar microplate reader[™] (BMG LabTechnologies) with a pipettor system. Agonistic activities were tested by injecting 20 µL buffer alone as negative control, standard agonist in buffer as positive control, and test compounds in buffer in rising concentrations, respectively, each into separate wells. Fluorescence measurement started simultaneously to the automatic injection. SKF 38393 was used as standard agonist for D₁ receptors and quinpirole for D₂ receptors (final concentration: 1 µM).

Screening for antagonistic activities was performed by pre-incubating the cells with 20 µL of the test compound dilutions (final concentrations: 100 µM, 50 µM, 10 µM, 5 µM, 1 µM, 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 0.1 nM) at 37 °C 30 min prior to injection of 20 µL standard agonist per well. As standard agonists we used, as described for the agonist screening, SKF38393 for D₁ and quinpirole for D₂ receptors, respectively. Fluorescence measurement also started simultaneously to the automatic injection. At least two independent experiments each in four or six replications were performed.

Fluorescence intensity was measured at 520 nm (bandwidth 25 nm) for 30 s at 0.4 s intervals. Excitation wavelength was 485 nm (bandwidth 20 nm). Agonistic or antagonistic activities were assessed by a dose response curve obtained by determination of the maximum fluorescence intensity of each data set and non-linear regression with sigmoidal dose response equation using GraphPadPrism[™] 3.0.

6. Supplementary data

Crystallographic data (excluding structure factors) has been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre as sup-

plementary publication CCDC 730823 for **7**, and CCDC 730824 for **10**. Copies of the data can be obtained free of charge on application to CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK [E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk].

Acknowledgments

The authors would like to thank Achim Meyer, who supported us with the synthesis of the dibenzo[c,g]quinolizines, as well as Bärbel Schmalwasser, Petra Wiecha and Heidi Traber for the reliable technical assistance in performing the pharmacological assays. Furthermore we would like to thank the DFG for financial support of the project (EN 875/1-1).

References and notes

1. Surgand, J. S.; Rodrigo, J.; Kellenberger, E.; Rognan, D. *Proteins* **2006**, *62*, 509.
2. Mohr, P.; Decker, M.; Enzensperger, C.; Lehmann, J. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2110.
3. Hoefgen, B.; Decker, M.; Mohr, P.; Schramm, A. M.; Rostom, S. A.; El Subbagh, H.; Schweikert, P. M.; Rudolf, D. R.; Kassack, M. U.; Lehmann, J. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 760.
4. Lovenberg, T. W.; Brewster, W. K.; Mottola, D. M.; Lee, R. C.; Riggs, R. M.; Nichols, D. E.; Lewis, M. H.; Mailman, R. B. *Eur. J. Pharmacol.* **1989**, *166*, 111.
5. Li, J. F.; Jin, G. Z.; Shen, J. S.; Shanghai, R. A. *Drugs Future* **2006**, *31*, 379.
6. Fu, W.; Shen, J.; Luo, X.; Zhu, W.; Cheng, J.; Yu, K.; Briggs, J. M.; Jin, G.; Chen, K.; Jiang, H. *Biophys. J.* **2007**, *93*, 1431.
7. Furneaux, R. H.; Gainsford, G. J.; Mason, J. M. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7665.
8. Meise, W.; Zymalkowski, F. *Arch. Pharm. Ber. Dtsch. Pharm. Ges.* **1971**, *304*, 182.
9. Heaney, H.; Shuhaibar, K. F. *Synlett* **1995**, 47.
10. Sawa, Y.; Hirose, K.; Maeda, S.; Hamada, Y. U.S. Patent 3,932,384, 1976.
11. NIMH Psychoactive Drug Screening Program (PDSP). **2006**. Internet Communication.
12. Chen, L. J.; Zhou, Q. T.; Dong, Z. J.; Yu, L. P.; Jin, G. Z. *Acta Pharmacologica Sinica* **1999**, *20*, 884.
13. COLLECT, Data Collection Software; Nonius B.V., Netherlands, 1998.
14. Otwinowski, Z.; Minor, W. In *Methods in Enzymology Macromolecular Crystallography*; Carter, C. W., Sweet, R. M., Eds.; Part A; Academic Press, 1997; Vol. 276, p 307.
15. Sheldrick, G. M. *Acta Crystallogr., Sect. A* **1990**, *46*, 467.
16. Sheldrick, G. M. *SHELXL-97* (Release 97-2), University of Göttingen, Germany, **19**.
17. Decker, M.; Lehmann, J. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2003**, *336*, 466.
18. Cheng, Y.; Prusoff, W. H. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099.
19. Kassack, M. U.; Hofgen, B.; Lehmann, J.; Eckstein, N.; Quillan, J. M.; Sadee, W. *J. Biomol. Screen.* **2002**, *7*, 233.

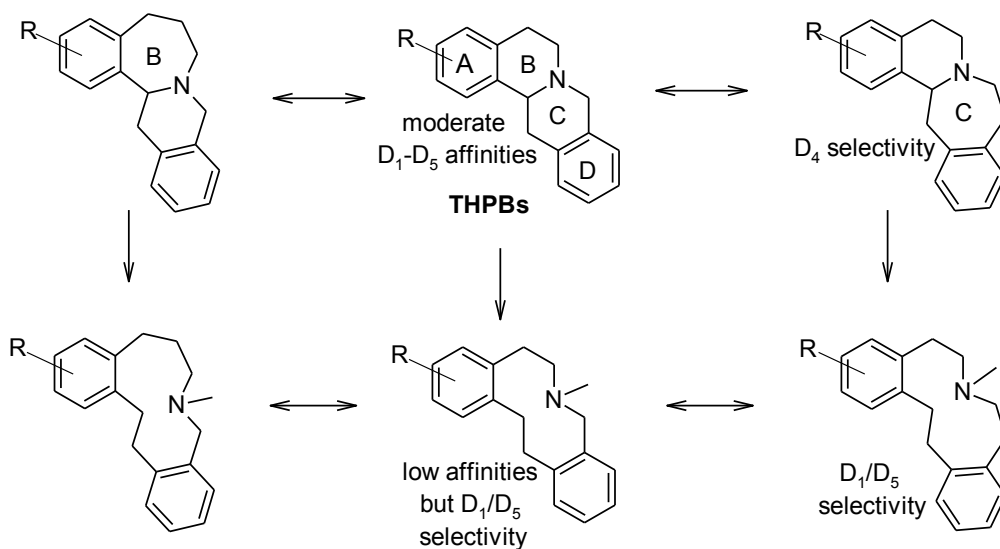
Publikation 2

Ring Expansions of Tetrahydroprotoberberines and Related Dibenzo[*c,g*]azecines Modulate the Dopamine Receptor Subtype Affinity and Selectivity

Maria Schulze, Oliver Siol, Werner Meise, Jochen Lehmann
und Christoph Enzensperger

Arch Pharm (Weinheim) **2010**, 343 (4): 207-214.

Gegenstand dieser Veröffentlichung sind Ringerweiterungen ausgehend von Tetrahydroprotoberberinen und Hexahydrodibenzo[*c,g*]azecinen. Bei den Zielverbindungen handelt es sich auch um zwei neue heterozyklische Ringsysteme. Im Rahmen dieser Arbeit standen neben der Synthese die Auswirkungen der Ringerweiterung auf Affinitäten an Dopamin-Rezeptoren im Vordergrund. B-Ring-Erweiterungen resultierten in dramatischen Affinitätsverlusten, während die C-Ring-erweiterten Homologen eine erhebliche Affinitätssteigerung im Vergleich zu den [*c,g*]-Azecinen aufwiesen. Die tetrazyklischen C-Ring-erweiterten Homologe erwiesen sich als D₄-selektive Verbindungen. Desweiteren wurden umfassende Struktur-Wirkungs-Beziehungen hinsichtlich der Zytotoxizität der untersuchten Substanzen aufgestellt, wobei die tetrazyklischen Verbindungen ohne Substitution am wenigsten toxisch waren.



Graphical Abstract

Eigenanteil: Synthese der neuen 11-Ring-Derivate. Interpretation der Daten aus pharmakologischen Assays. Erstellung des Manuskripts.

Full Paper

Ring Expansions of Tetrahydroprotoberberines and Related Dibenzo[*c,g*]azecines Modulate the Dopamine Receptor Subtype Affinity and Selectivity

Maria Schulze¹, Oliver Siol², Werner Meise³, Jochen Lehmann¹, and Christoph Enzensperger¹

¹ Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische/Medizinische Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena, Germany

² Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena, Germany

³ Institut für Pharmazie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn, Germany

The affinities of tetrahydroprotoberberines for dopamine receptors dramatically decrease after cleaving the central C-N bond to the analogous ten-membered dibenzo[*c,g*]azecines [1]. In the present work, we also synthesized eleven-membered homologues of these heterocycles and measured the affinities of the resulting dibenzazaundecenes and their underlying homoberberines for human dopamine receptors as well as the cytotoxic effects of all target compounds on human glia cells. The tetracyclic iso-C-homoberberine-derivatives revealed to be D₄-selective antagonists, while all other active compounds showed a significant D₁/D₅ selectivity. Distances in energy-minimized conformations were measured in order to explain our findings.

Keywords: Azecines / Cytotoxicity / Dopamine receptor / SAR / Scaffold

Received: November 3, 2009; Accepted: December 2, 2009

DOI 10.1002/ardp.200900267

Introduction

Dopamine receptors play a key role in many psychiatric, motoric, or endocrinologic disorders. Even though there are many compounds targeting the dopamine system, it is not clarified yet if a certain selectivity profile at the dopamine receptor subtypes might be advantageous for clinical use. Antipsychotic drugs used in therapy exert different selectivity profiles (*e. g.* haloperidol and clozapine). While haloperidol has the highest affinities for D₂ and D₃ receptors, clozapine preferably binds to D₁ and D₄ receptors and causes less extrapyramidal side effects [2]. Thus, it is still attractive to look for new scaffolds with novel selectivity profiles to investigate the therapeutic value of subtype-selective compounds and to perform

Correspondence: Christoph Enzensperger, Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische/Medizinische Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Philosophenweg 14, D-07743 Jena, Germany.
E-mail: ch.enzensperger@uni-jena.de
Fax: +49 3641 949-802

Abbreviation: tetrahydroprotoberberines (THPBs)

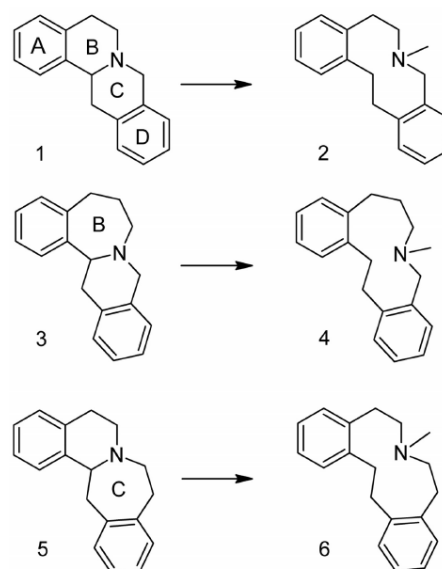
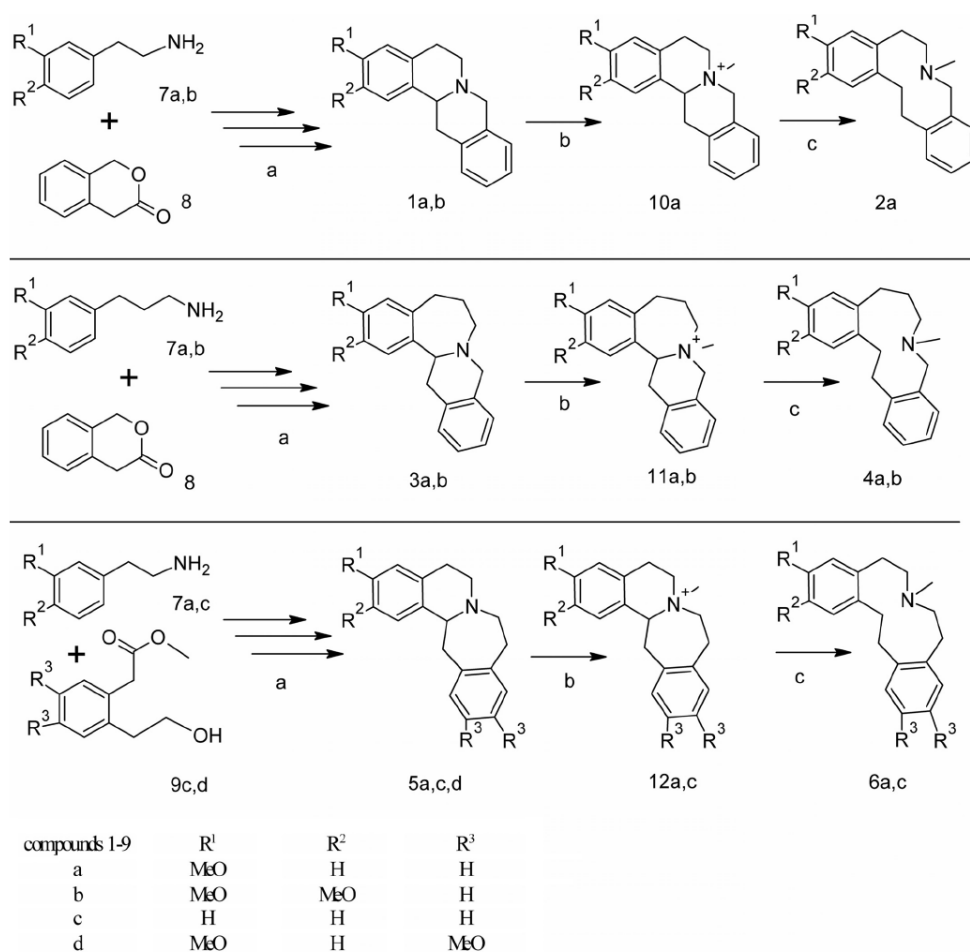


Figure 1. Scaffolds of the test compounds: the underlying tetracyclic structures and ring-opened azecine- and azacycloundecene scaffolds.



Reagents and Conditions: (a) i) toluene reflux; ii) POCl₃, MeCN; iii) NaBH₄/MeOH; (b) methyl iodide, MeCN; (c) Na/NH₃^{liq}.

Scheme 1. Synthesis of compounds 1–6.

cross-target SAR-studies within the dopamine receptors. In former studies, we investigated tetrahydropyprotoberberines (THPBs) **1** along with their ring-opened derivatives **2** and found that ring opening of **1a** to **2a** decreases dopamine receptor affinities dramatically [1]. Furthermore, ring expansion goes along with a shift of selectivity from similar antagonist activities at all receptors for **1a**, toward D₁/D₅ selectivity for **2a**.

In the present study, we applied this ring-opening approach on ring-enlarged THPBs to obtain B- (**3**) and C-homologues **5**, which were synthesized by Meise *et al.* [3, 4]. Compounds **3** and **5** were quaternized with methyl iodide, followed by cleavage of the central C–N bond with Na in liq. NH₃. The resulting eleven-membered homologues **4** and **6** represent derivatives of novel heterocyclic ring systems (Fig. 1). They were investigated together with the THPB-homologues **3** and **5** with respect to their

affinity and selectivity profiles for all dopamine receptor subtypes (radioligand binding and functional calcium assay).

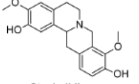
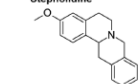
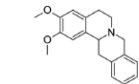
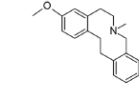
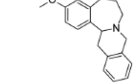
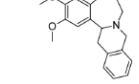
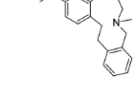
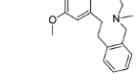
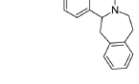
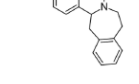
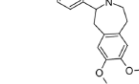

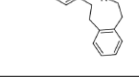
Low general cytotoxicity of candidate compounds is a basic requirement for drug development. Accordingly, we measured the cytotoxicity of our target compounds up to 250 μM by an *in-vitro* cell-culture-based MTT assay.

Results and discussion

Chemistry

The synthesis of compounds **1–6** is outlined in Scheme 1. Ring expanded THPB homologues **3** and **5** were synthesized according to previously described procedures [3, 4], starting with substituted phenylethyl- or phenylpropylamines **7** and a suitable lactone **8**, or its corresponding

Table 1. Affinities (K_i) for dopamine D_1 – D_5 receptor subtypes determined by radioligand-binding experiments.

Compound	(Radioligand binding studies) K_i (nM)				
	D_1	D_{2L}	D_3	$D_{4.4}$	D_5
 Stepholidine	5.9 [{]	974 [{]	30 (rat) [{]	3748 [{]	4.4 [{]
 1a	183.5 ± 27.5 [#]	320 ± 159 [§]	251 ± 56 [#]	2565 ± 1673 [§]	185 ± 97 [#]
 1b	474 ± 156 [§]	1093 ± 61.5 [#]	1122 ± 30.5 [#]	>10000	398 ± 150.5 [#]
 2a	1727 ± 238 [§]	>10000	>10000	>10000	1508 ± 136 [#]
 3a	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
 3b	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
 4a	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
 4b	2343 ± 43 [#]	>10000	>10000	>10000	>10000
 5a	662 ± 172 [#]	>10000	>10000	224 ± 117 [#]	1174 ± 221 [#]
 5c	1446 ± 176 [#]	4475 ± 14.5 [#]	>10000	427 ± 230 [#]	626 ± 230 [§]
 5d	1482 ± 329 [#]	>10000	>10000	282 ± 115 [§]	843 ± 243 [#]
 6a	119 ± 74 [§]	1502 ± 443 [#]	3120 ± 1085 [#]	726 ± 131 [#]	492 ± 293 [§]
 6c	118 ± 57 [§]	917 ± 151 [#]	3045 ± 22 [#]	475 ± 254 [#]	97.5 ± 30 [#]

§ Experiments were performed in triplicate, values are given as mean ± SD; # experiments were performed twice, values are given as mean ± SEM; { values are from the PDSP database [5].

hydroxy ester **9**. Ring opening was performed after quaternization with methyl iodide under Birch conditions (liq. NH_3/Na ; Scheme 1).

Pharmacology

The affinities of the tetracyclic and tricyclic compounds were determined by radioligand-binding experiments at all human cloned dopamine receptors according to a previously described method [1]. The K_i values of the binding assay are given in nM units. Their functionalities were defined by an intracellular calcium assay [1] (Table 1).

The investigated tetracyclic THPBs **1a**, **b** showed affinities for all dopamine receptors, but preferable for D_1/D_5 . The lowest affinities were detected for the D_4 receptor. Stepholidine, a well studied representative of the THPBs is a ligand for dopamine receptors, which has agonistic activities at D_1 and antagonist properties at D_2 receptors [6]. Yet, all our compounds turned out to be antagonists for D_1 and D_2 receptors. This may be explained by the different substitution pattern compared to stepholidine, whose phenolic group in position 2 is similar to the intrinsic agonist dopamine. At all our molecules, this OH-group is missing. It can be speculated that this particular phenolic group is crucial for the functionality at dopamine receptors. Ring opening of **1a** to dibenzo[c,g]-azecine **2a** lead to a nearly complete loss of affinities. Only at the D_1 and D_5 receptor micromolar affinities could be detected. Neither ring expansion of ring B of the THPBs **1a**, **b** to isochino[3,2-*a*]benzazepines **3a**, **b** nor their ring opening to the respective dibenzo[c,g]azacycloundecenes **4a**, **b** led to ligands with noteworthy affinities for dopamine receptors. But on the contrary, when THPBs **1a**, **b** were expanded at the central C-ring, we obtained antagonists with K_i values comparable with those of the parent THPBs. In contrast to THPBs, the homo-C congeners **5a**, **c**, **d** exhibited a distinct D_4 selectivity and almost no affinity for D_3 receptors. This might be interesting, since Seeman *et al.* observed that D_4 receptors were elevated in the brains (*post mortem*) of schizophrenic patients [8]. Furthermore, the atypical antipsychotic drug clozapine was found to bind more tightly to D_4 receptors than to the other dopamine receptor subtypes [2]. Clinical evidence for the influence of D_4 receptors in schizophrenia was proved by D_4 selective antagonists [9]. Interestingly, ring opening of homo-C THPB derivatives **5a**, **c** to compounds **6a**, **c** increased the affinities for D_1 , D_2 , D_3 , and D_5 receptors. Only at D_4 receptors, affinities revealed to be the same or were even decreased. Thus, compounds **6a**, **c** are D_1 - or in case of **6c** D_1/D_5 -selective, with the weakest affinity for D_3 . The increase of affinities by providing higher conformational flexibility was discussed in a previous paper [1]. Conclusively, we can de-

Table 2. MTT test results measured on human glia cells.

Compound	Viability at 100 μM (%)	cc_{50} (μM)
1a	97.8 \pm 5.2	>250
2a	77.3 \pm 22.6	158.7 \pm 14.7
3a	94.2 \pm 3.3	>250
3b	91.8 \pm 4.2	>250
4a	115.8 \pm 9.9	165.4 \pm 9.8
4b	78.9 [§]	poor solubility
5a	63.7 \pm 1.4	poor solubility
5c	99.3 \pm 11.0	>250
5d	93.2 \pm 8.0	>250
6a	71.2 \pm 8.4	125.1 \pm 15.7
6c	91.7 \pm 17.3	177.5 \pm 18.0

§ Due to poor solubility, all values except one were discarded.

monstrate that ring opening, going along with higher conformational flexibility, maintains or even increases the affinity of the already active homo-C THPBs but does not turn the inactive homo-B derivatives into compounds with distinct affinity.

It is an essential feature for all CNS drugs not to be toxic. During screening investigations, we observed for the dibenzo[c,g]azecine **2a** cytotoxic effects on glia cells. Therefore, we screened all target compounds using an *in-vitro* MTT-assay on human U87-MG glia cells at 100 μM and determined cc_{50} values up to 250 μM (see Table 2). Solubility of all compounds in all concentrations was monitored by microscopy. Values of incompletely dissolved compounds were neglected.

Ring expansion of THPBs **1** to C- and B-homologues, **3** and **5**, respectively, and their ring-opened derivatives, **4** and **6**, respectively, did not decrease cytotoxicity in general. The results are rather inconsistent. Neither a specific scaffold nor one of the substitution patterns could be identified as responsible for toxicity. In general, ring opening led to higher toxicity. Almost all ring-closed compounds showed no toxicity up to 250 μM . At 100 μM , the methoxylated dibenzo[c,g]azecine **2a**, the C-ring-expanded monomethoxylated compounds **5a** and **6a** and the dimethoxy-substituted B-homologue **4b** displayed cytotoxic effects (viability of cells compared to control <90%). Unfortunately, the poor solubility of compounds **4b** and **5a** precluded us from determining their exact cc_{50} values. Focusing on the monomethoxy series, C-ring expansion led to higher toxicity, while the B-homologues showed no (**3a**) or less (**4a**) toxic effects. The unsubstituted homo-C-derivatives **5c** and **6c** showed significant lower cytotoxicity than their aromatic-substituted congeners.

In-silico studies

Structure-based modeling is difficult for the dopamine receptors, since the X-ray structure or a reliable homol-

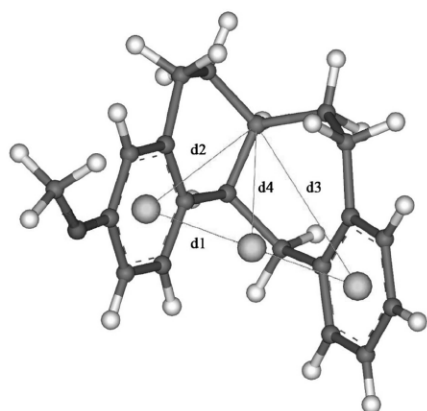


Figure 2. Measured distances of energy-minimized conformation of compound **5a**.

ogy model is not available so far. Nevertheless, we wanted to compare the conformational space of the pharmacophors in order to correlate distances with the affinities for dopamine receptors.

Therefore, we measured the following distances: Between the centroids of the two aromatic moieties (d1), from the nitrogen to the substituted aromatic moiety (d2) and the unsubstituted one (d3), respectively. Moreover, we determined the distance between the nitrogen and the center between the two aromatic moieties, which is a parameter for the angulations of the whole molecule (d4). In Fig. 2, as an example, these distances are demonstrated for compound **5a**.

In order to select a reasonable conformation for the minimization, we relied on the observations reported for (*l*)-stepholidine before [10]. Herein it is assumed that (*l*)-stepholidine binds in its *cis*-protonated conformation to the binding pocket. Hence, we used the *cis*-protonated (*l*)-stepholidine as template for our tetracyclic compounds (**1**, **3**, and **5**) prior to energy minimization. To complement our investigations, we also measured the respective *trans*-isomers (**1a**, **3a**, **5a**) (Table 3). Due to their high flexibility, it is difficult to include the ring-opened derivatives (**2**, **4**, and **6**) to this investigation. Computational examinations on this special topic are ongoing.

The active compounds within our investigated set are **1a-cis** and **5a-cis**. It is obvious that the distances between the two aromatics (d1) of these two compounds are significantly shorter compared to all other molecules we examined. The other way around can be observed for the distance between the nitrogen and the center between the aromatic rings (d4) where the distances are significantly longer. These two parameters reflect the strongly angulated shape of compounds **1** and **5**. Since the homo-B derivative **3a**, which lacks affinity, does not show such a

Table 3. Distances in energy-minimized conformations of the tetracycles **1**, **3**, **5** between the centroids of the two aromatic moieties (d1), from the nitrogen to the substituted aromatic moiety (d2) and to the unsubstituted one (d3), and between the nitrogen and the center between the two aromatic moieties (d4).

Compound	Measured distances (Å)			
	d1	d2	d3	d4
1a cis	4.678	3.844	3.774	3.007
1a trans	6.612	3.806	3.755	1.834
3a cis	6.535	3.944	3.697	1.984
3a trans	6.592	3.940	3.773	2.005
5a cis	4.504	3.821	4.478	3.501
5a trans	6.311	3.842	3.747	2.108

picture, the flexed structure of **1** and **5** might be responsible for their affinity.

Conclusion

Though our affinities gains were, in general, only moderate, we could observe some interesting changes in the selectivity at the dopamine receptor subtypes by ring enlargement of tetrahydroprotoberberines (THPBs) and their corresponding dibenz[*c,g*]azecines. Ring expansion of the C-ring in the THPBs to isochino[1,2-*b*][3]benzazepines (**5a**, **c**, **d**) yielded dopamine antagonists with distinct D₄ selectivity, while the expansion of the other central ring (B) led to compounds with much lower affinities for all dopamine receptor subtypes. We assume that the highly flexed conformation might be responsible for the affinities of the homo-C derivatives **5** and the missing affinities of homo-B derivatives **3**. By ring opening of the enlarged, but still active tetracycles **5** to compounds **6**, the D₄ selectivity of **5** changed into a D₁/D₅ preference, going along with increased affinities. Cytotoxic effects were found preferable for the ring-opened compounds. Substitution at the aromatic ring systems seems to be disadvantageous regarding cytotoxicity. The unsubstituted compound **5c** displays the lowest cytotoxicity of all active compounds. Furthermore, **5c** shows a new selectivity profile and, hence, might be used for the further development of atypical antipsychotics.

Experimental

Chemistry

Syntheses were performed under nitrogen with solvents and reagents of commercial availability with no further purification. Melting points are uncorrected and were measured in open capillary tubes, using a Gallenkamp melting point apparatus (Weiss-Gallempkamp, London, UK). ¹H- and ¹³C-NMR spectral data

were obtained from a Bruker Advance 250 spectrometer (250 MHz) and Advance 400 spectrometer (400 MHz), (Bruker, Rheinstetten, Germany) respectively. Elemental analyses were performed on a Heraeus Vario EL apparatus (Heraeus, Hanau, Germany) for all test compounds. MS data were determined by GC/MS, using a Hewlett-Packard GCD-Plus (G1800C) apparatus (HP-5MS column; J&W Scientific, Folsom, CA, USA). Synthesis and analytical data of compounds **1** and **2** were described previously [1].

3-Methoxy-5,6,7,9,14,14a-hexahydroisoquinol[3,2-a][2]benzazepine 3a and 2,3-dimethoxy-5,6,7,9,14,14a-hexahydroisoquinol[3,2-a][2]benzazepine 3b

Isochroman-3-one (25 mmol, 3.7 g) and a suitable phenethylamine/phenpropylamine, respectively (25 mmol) were refluxed in toluene (100 mL) for 6 h. After cooling to room temperature, the amide precipitated as a white solid, which could be filtered off. The solid was washed twice with toluene and dried *in vacuo* to remove the starting material. The product could be identified by the typical two singlets in ¹H-NMR spectrum at 4.65 and 3.59 ppm. The amide was refluxed in 50 mL of a mixture of phosphoryl chloride in acetonitrile (1:8) for 18 h. After evaporation of the solvents, the resulting brown oil was washed twice with petroleum ether and the residue was solved in methanol. Cooled by an ice bath, a ten-fold excess of sodium boron hydride was added in small portions. The suspension was refluxed for half an hour. After evaporation of the solvent, the residue was dissolved in water and extracted with ethyl acetate. The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated *in vacuo*. The resulting yellow oil was crystallized from methanol to yield the respective tetracycle. Analytical data is given in reference [4]. Yields and melting points: for compound **3a**: yield 29%, white crystals, m.p. 129°C; for compound **3b**: yield 31%, white crystals, m.p. 91–93°C.

3-Methoxy-5,6,8,9,14,14a-hexahydroisoquinol[1,2-b][3]benzazepine 5a and 5,6,8,9,14,14a-hexahydroisoquinol[1,2-b][3]benzazepine 5c

The synthesis was performed according to a procedures described before [3], starting with a phenethylamine (2.4 mmol) and methyl[2-(2-hydroxyethyl)phenyl]acetate (2 mmol). The crude products were crystallized from toluene. Analytical data is given in reference [3]. Yields and melting points: for compound **5a**: yield 32%, white crystals, m.p. 80–82°C; for compound **5c**: yield 22%, white crystals, m.p. 61–62°C.

3-Methoxy-8-methyl-5,6,7,9,14,14a-hexahydroisoquinol[3,2-a][2]benzazepinium iodide 11a, 2,3-dimethoxy-8-methyl-5,6,7,9,14,14a-hexahydroisoquinol[3,2-a][2]benzazepinium iodide 11b, 3-methoxy-7-methyl-5,6,8,9,14,14a-hexahydroisoquinol[1,2-b][3]benzazepinium iodide 12a, and 7-methyl-5,6,8,9,14,14a-hexahydroisoquinol[1,2-b][3]benzazepinium iodide 12c

10 mmol of the tetracyclic compounds (**3**, **5**) were solved in acetonitrile (20 mL). A 20-fold excess of methyl iodide was added and the mixture stirred overnight. The quaternary ammonium salt precipitated as white to light yellow powder and could be isolated by filtration. Washing with small amounts of acetonitrile

and drying *in vacuo* resulted in the pure products with almost 100% yield.

Compound 11a

Yield: 98.2%, white powder, m.p.: 215°C; ¹H-NMR 250 MHz (CDCl₃) δ: 1.97–2.13 (m, 2H), 2.76–2.91 (m, 1H), 3.11–3.29 (m, 2H), 3.39 (s, 3H, NMe), 3.53–3.82 (m, 2H), 3.78 (s, 3H, OMe), 3.91–3.96 (d, 1H, J = 13.9 Hz), 5.18–5.24 (d, 1H, J = 15.2 Hz), 5.59–5.69 (m, 2H), 6.72–6.78 (m, 2H), 7.13–7.29 (m, 4H), 7.74–7.77 (d, 1H, J = 8.3 Hz); ¹³C-NMR, dept 250 MHz (CDCl₃) δ: 23.1, 30.5, 34.0, 48.6 (NMe), 55.5 (MeO), 59.8, 67.5, 73.6 (14a), 112.0, 117.6, 123.5, 126.6, 127.4, 127.8, 128.4, 128.8, 129.6, 134.4, 141.4; 160.6. Anal. calcd. for C₂₀H₂₄INO · 0.25 H₂O: C 56.41%, H 5.80%, N 3.29%; found: C 56.21%, H 5.75%, N 3.11%.

Compound 11b

Yield: 96.5%, white powder, m.p.: 220°C; ¹H-NMR 250 MHz (DMSO-*d*₆) δ: 1.92–2.22 (m, 2H), 2.71–2.81 (m, 2H), 3.05 (s, 3H, NMe), 3.24–3.52 (m, 2H), 3.75–3.84 (m, 8H), 4.73–5.05 (dd, 2H, J = 64.6; 15.5 Hz), 5.10–5.17 (dd, 1H, J = 13.2; 4.8 Hz); 6.92 (s, 1H); 7.04 (s, 1H), 7.24–7.32 (m, 4H); ¹³C-NMR 250 MHz (DMSO-*d*₆) δ: 23.1, 29.9, 32.5, 48.9 (NMe), 56.1, 56.7, 59.2, 67.8, 73.7, 115.6, 116.4, 124.3, 127.2, 127.5, 127.7, 128.6, 129.2, 131.2, 133.8, 147.3, 149.4. Anal. calcd. for C₂₁H₂₆INO · 0.10 H₂O: C 55.30%, H 6.03%, N 2.79%.

Compound 12a

Yield: 94.0%, white solid, m.p.: 255°C; ¹H-NMR 250 MHz (methanol-*d*₄) δ: 3.27 (s, 3H, NMe), 3.13–3.35 (m, 4H), 3.41–3.57 (m, 2H), 3.78 (s, 3H, MeO), 3.65–3.97 (m, 3H), 4.15–4.32 (m, 1H), 4.94–4.98 (d, 1H, J = 9.8 Hz), 6.85 (s, 1H), 6.90–6.94 (d, 1H, J = 8.7 Hz), 7.22–7.39 (m, 5H). Anal. calcd. for C₂₀H₂₄INO · 0.25 H₂O: C 56.13, H 6.01, N 2.98.

Compound 12c

Yield: 91.8%, white solid, m.p.: 257°C; ¹H-NMR 250 MHz (methanol-*d*₄) δ: 3.27 (s, 3H, NMe), 3.30–3.49 (m, 4H), 3.55–4.01 (m, 5H), 4.20–4.41 (m, 1H), 5.01–5.05 (d, 1H, J = 9.9 Hz), 7.24–7.39 (m, 8H). Anal. calcd. for C₁₉H₂₂IN: C 58.32%, H 5.67%, N 3.58%.

11-Methoxy-6-methyl-6,7,8,9,14,15-hexahydro-5H-dibenzo[c,g]azacycloundecene hydrochloride 4a, 11,12-dimethoxy-6-methyl-6,7,8,9,14,15-hexahydro-5H-dibenzo[c,g]azacycloundecene hydrochloride 4b, 3-methoxy-7-methyl-6,7,8,9,14,15-hexahydro-5H-dibenzo[d,h]azacycloundecene hydrochloride 6a, and 7-methyl-6,7,8,9,14,15-hexahydro-5H-dibenzo[d,h]azacycloundecene hydrochloride 6c

In a 100-mL three-neck flask equipped with a balloon as an overflow tank and cooled in a liquid nitrogen bath, ammonia was condensed until it was 3/4 filled. The cooling bath was removed and the ammonia was allowed to liquefy. After suspending 1 mmol of the quaternary ammonium salts (**11**, **12**) in the liquid ammonia, small pieces of sodium were added to the stirred mixture until the developing blue colour remained for 10–15 min. The mixture was quenched with 1–2 drops of saturated aqueous NH₄Cl. The ammonia was evaporated under nitrogen and the residue portioned between ether and water. The aqueous phase was extracted with ether (3–15 mL) and the pooled organic

phases were dried over MgSO_4 and evaporated. Products were purified by column chromatography ($\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3$; 1:3). The product fractions were merged and the solvent removed *in vacuo*. The resulting oil was dissolved in little methanol, followed by the addition of a few drops of etheric HCl and crystallization from methanol/ether.

Compound 4a

Yield: 32%, white powder, m.p.: 231°C ; $^1\text{H-NMR}$ 400 MHz (methanol- d_4) δ : 2.05–2.47 (m, 4H), 2.76–2.90 (m, 2H), 3.01–3.15 (m, 5H), 3.41 (s, 1H, 5), 3.34–3.49 (m, 2H), 3.77 (s, 3H, OMe), 4.16 (s, 1H, 5), 6.75–6.82 (m, 2H), 7.23–7.25 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.33–7.38 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.48–7.55 (m, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ 400 MHz (methanol- d_4) δ : 23.9, 24.8, 28.3, 33.3, 33.6, 42.2, 54.4, 55.5, 111.9, 115.2, 126.7, 130.2, 130.5, 130.5, 130.8, 131.4, 132.5, 140.4, 142.8, 158.4. Anal. calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{ClNO} \cdot 0.20 \text{ H}_2\text{O}$: C 71.61%, H 8.21%, 3.96%.

Compound 4b

Yield: 43%, white crystals, m.p.: 218°C ; $^1\text{H-NMR}$ 250 MHz (methanol- d_4) base δ : 1.58–1.90 (m, 4H), 2.16 (s, 3H, NMe), 2.37–2.51 (m, 2H), 2.59–2.90 (m, 4H), 2.92–3.50 (m, 2H), 3.86 (s, 3H, OMe), 3.92 (s, 3H, OMe), 6.70 (s, 1H, 1), 6.80 (s, 1H, 4), 7.15–7.34 (m, 4H); $^{13}\text{C-NMR}$ 250 MHz (methanol- d_4) δ : 23.8, 31.7, 32.6, 32.9, 47.6, 55.1, 55.1, 55.2, 114.7, 116.4, 125.7, 126.2, 126.8, 126.9, 129.1, 134.0, 136.5, 139.9, 146.9, 149.5; GC-MS (m/z): 265 (4%), 250 (2%), 234 (4%), 219 (1%), 207 (2%), 193 (5%), 178 (8%), 160 (14%), 146 (29%), 130 (13%), 115 (66%), 104 (100%), 91 (53%), 78 (87%), 65 (28%). Anal. calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{ClNO}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$: C 63.53%, H 7.85%, N 3.26%.

Compound 6a

Yield: 73%, white powder, m.p.: 96°C ; $^1\text{H-NMR}$ 250 MHz (methanol- d_4) δ : 2.87–2.91 (m, 7H), 3.02–3.10 (m, 4H), 3.47–3.51 (m, 4H), 3.76 (s, 3H, OMe), 6.79–6.82 (m, 2H), 7.12–7.38 (m, 5H); $^{13}\text{C-NMR}$, dept 250 MHz (Methanol- d_4) δ : 26.4, 26.6, 33.4, 34.3, 40.7 (N-Me), 53.7, 54.4 (O-Me), 112.8, 115.4, 126.3, 127.4, 129.9, 130.1, 131.0, 131.9, 134.9, 136.1, 140.1, 158.3; GC-MS (m/z): 325 (2%), 292 (2%), 283 (2%), 265 (8%), 253 (4%), 239 (5%), 220 (12%), 206 (4%), 189 (1%), 178 (15%), 165 (7%), 154 (11%), 146 (24%), 131 (20%), 117 (61%), 104 (100%), 91 (67%), 78 (82%), 65 (32%). Anal. calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{ClNO} \cdot \text{H}_2\text{O}$: C 69.39%, H 8.19%, N 3.73%.

Compound 6c

Yield: 62%, white powder, m.p.: 145°C ; $^1\text{H-NMR}$ 450 MHz (methanol- d_4) δ : 2.91–2.98 (m, 7H), 3.09–3.13 (t, $J = 7.4$ Hz, 4H), 3.47–3.51 (t, $J = 7.5$ Hz, 4H), 7.16–7.21 (m, 2H), 7.24–7.28 (m, 4H), 7.39–7.41 (m, 2H); $^{13}\text{C-NMR}$, dept 400 MHz (methanol- d_4) δ : 26.3, 34.1, 40.6 (N-Me), 53.8, 126.4, 127.4, 130.0, 130.2, 134.8, 140.0; GC-MS (m/z): 295 (1%), 280 (2%), 264 (3%), 249 (1%), 235 (1%), 223 (3%), 204 (1%), 190 (4%), 178 (5%), 160 (5%), 147 (24%), 132 (14%), 117 (47%), 104 (100%), 91 (72%), 78 (79%), 65 (32%). Anal. calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{ClN} \cdot 0.30 \text{ H}_2\text{O}$: C 72.83%, H 8.33%, N 4.24%.

Pharmacology

Radioligand binding experiments and the functional calcium assay were performed as described in detail in a former publication [1]. Human D_1 , D_{2L} , D_3 , and D_5 receptors were expressed in HEK cells and $\text{D}_{4.4}$ receptors were expressed in CHO cells, respectively.

Radioligand binding experiments

Cells were grown at 37°C under a humidified atmosphere of 5% CO_2 :95% air in HAM/F12-medium (Sigma-Aldrich, Germany) for CHO cells and Dulbecco's modified Eagles Medium Nutrient mixture F-12 Ham for HEK293 cells, each supplemented with 10% fetal bovine serum, 1 mM L-glutamine and 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of G 418 (all by Sigma-Aldrich).

Radioligand binding assays with a whole-cell-suspension [1] were carried out in triplicate in a volume of 550 μL in 96-well plates (Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany), containing: TRIS-Mg^{2+} -buffer (345 μL), $[\text{H}^3]$ -ligand (50 μL), whole-cell-suspension (100 μL), and appropriate drug dilutions (55 μL). $[\text{H}^3]$ SCH23390 was used as radioligand for D_1 and D_5 , and $[\text{H}^3]$ spiperone for D_2 - D_3 . Non-specific binding was determined using fluphenazine (100 μM) for D_1 and D_5 tests and haloperidol (10 μM) for D_2 , D_3 , and D_4 tests. For determining the K_i values at least two independent experiments, each in triplicate, were performed. The competition binding data were analyzed with Graph Pad PrismTM 3.0. K_i values were calculated from IC_{50} values applying the equation of Cheng and Prusoff [11].

Functional calcium assay

Screening for agonistic and antagonist activity was performed in an intracellular calcium assay using a NOVOstar microplate readerTM (BMG LabTechnologies, Offenburg, Germany) with a pipettor system. Agonistic activities were tested by injecting 20 μL buffer alone as negative control, standard agonist in buffer as positive control (final concentration: 1 μM), and test compounds in buffer in rising concentrations, respectively, each into separate wells. Screening for antagonist activities was performed by pre-incubating the cells with 20 μL of the test compound dilutions (final concentrations: 100 μM , 50 μM , 10 μM , 5 μM , 1 μM , 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 0.1 nM) at 37°C 30 min prior to injection of 20 μL standard agonist per well. Fluorescence measurement started simultaneously to the automatic injection. SKF 38393 was used as standard agonist for D_1 receptors and quinpirole for D_2 receptors. At least two independent experiments each in four or six replications were performed. Fluorescence intensity was measured at 520 nm (bandwidth 25 nm) for 30 s at 0.4-s intervals. Excitation wavelength was 485 nm (bandwidth 20 nm). Agonistic or antagonist activities were assessed by a dose-response curve obtained by determination of the maximum fluorescence intensity of each data set and non-linear regression with sigmoidal dose-response equation using Graph Pad PrismTM 3.0.

MTT-test

U87-MG glia cells (ATCC HTB-14) were cultured at 37°C , and 5% CO_2 in DMEM (PAA, E15-883) + 10% FCS (Thermo Scientific HyClone, Logan UT, USA). In 96-well plates, 15 000 cells were dispersed in 200 μL into each well. After 24 h, the medium was replaced by DMEM + FCS containing the test compound solved in a final concentration of 0.25% DMSO. To minimize edge-effects as mentioned by Rasmussen [12], each concentration of each compound was measured in six wells distributed across the 96-well plate and only the inner 6 6 10 wells of the plate were analyzed. The outer wells were filled with 200 μL PBS-buffer. As positive control, six wells with cells and medium containing 0.25% DMSO were analyzed. After 24 h of incubation, the medium was removed and 100 μL MTT (Fluka), dissolved in phenol-red-free DMEM (without FCS) at 0.5 mg/mL, were added to

each well. The plates were incubated for 4 h. Cells were killed and formazan crystals were solubilized by addition of 100 μ L of 20% sodium dodecylsulfate (SDS) in H₂O followed by incubation overnight at 37°C. Optical density was measured at 544 nm using a microplate reader (Galaxy FluoStar, BMG Labtechnologies) with background subtraction (compounds in the same preparation without cells). Cytotoxicity values were calculated as percentage of positive control (= 100%). CC₅₀ values were calculated with Graph Pad Prism™ 3.0. All experiments were repeated at least three times.

In-silico studies

Energy minimization was performed with ChemAxon Marvin software and measuring of the distances was done with Accelrys® Discovery Studio Visualizer 2.0.

The authors would like to thank Franziska Müller, Bärbel Schmalwasser, Petra Wiecha and Heidi Traber for the reliable technical assistance in performing the pharmacological assays. Furthermore we would like to thank the DFG for financial support of the project (EN 875/1-1).

The authors have declared no conflict of interest.

References

- [1] M. Schulze, F. U. Müller, J. M. Mason, J. Lehmann, C. Enzensperger, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17 (19), 6898–6907.
- [2] M. Rowley, L. J. Bristow, P. H. Hutson, *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 477–501.
- [3] M. Clemens, W. Meise, K. Himmel, M. Jansen, *Liebigs Ann. Chem.* **1997**, 447–457.
- [4] W. Meise, D. Zlotos, M. Jansen, N. Zoche, *Liebigs Ann. Chem.* **1995**, 567–574.
- [5] NIMH Psychoactive Drug Screening Program (PDSP) **2009**. *Internet Communication*.
- [6] G. Z. Jin, Z. T. Zhu, Y. Fu, *Trends Pharmacol. Sci.* **2002**, 23, 4–7.
- [7] C. Enzensperger, F. K. U. Müller, B. Schmalwasser, P. Wiecha, *et al.*, *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 4528–4533.
- [8] P. Seeman, H. C. Guan, H. H. M. van Tol, *Nature* **1993**, 365, 441–445.
- [9] R. S. Mansbach, E. W. Brooks, M. A. Sanner, S. H. Zorn, *Psychopharmacology (Berl.)* **1998**, 135 (2), 194–200.
- [10] W. Fu, J. Shen, X. Luo, W. Zhu, *et al.*, *Biophys. J.* **2007**, 93, 1431–1441.
- [11] Y. Cheng, W. H. Prusoff, *Biochem. Pharmacol.* **1973**, 22, 3099–3108.
- [12] T. H. Rasmussen, J. B. Nielsen, *Biomarkers* **2002**, 7 (4), 322–336.

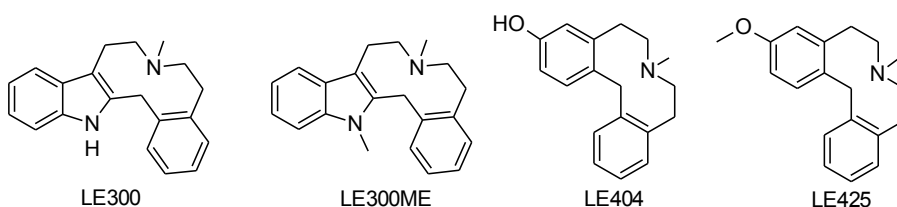
Publikation 3

Molecular Combination of the Dopamine and Serotonin Scaffolds Yield in Novel Antipsychotic Drug Candidates – Characterization by *in vivo* Experiments

Maria Schulze, Oliver Siol, Dina Robaa, Franziska Müller, Christian Fleck
und Jochen Lehmann

J Med Chem, eingereicht 14.04.2010.

In dieser Arbeit wurde erstmals die neuroleptische Potenz der [d,g]-Azecine im Tiermodell belegt. Dazu wurden sowohl die Wirkung auf die Positivsymptomatik der Schizophrenie als auch das Hervorrufen von extrapyramidalen Nebenwirkungen durch die Substanzen in Tiermodellen untersucht. Im Stabsprung-Experiment waren die Substanzen LE300ME und LE404 ähnlich potent wie Haloperidol und Risperidon und zeigten erst bei wesentlich höheren Dosen als die Standardverbindungen Katalepsie, die als verlässliches Modell für das Auftreten extrapyramidaler Symptome gilt. Ebenso lieferten Tests zur oralen Bioverfügbarkeit vielversprechende Ergebnisse. Abschließend wurden in der Veröffentlichung Korrelationen zwischen Affinitäten zu Dopamin- bzw. Serotonin-Rezeptoren und den *in vivo*-Ergebnissen diskutiert.



Graphical Abstract

Eigenanteil: Etablierung der verwendeten Tierversuche am Institut. Planung und Durchführung der Experimente. Graphische und statistische Auswertung der Versuche. Erstellung des Manuskripts.

Molecular Combination of the Dopamine and Serotonin Scaffolds Yield in Novel Antipsychotic Drug Candidates – Characterization by *in vivo* Experiments

Maria Schulze^a, Oliver Siol^b, Dina Robaa^a, Franziska K. U. Mueller^a, Christian Fleck^c and Jochen Lehmann^{a,d,*}

^aInstitut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische/Medizinische Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Philosophenweg 14, 07743 Jena, Germany

^bInstitut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Semmelweisstraße 10, 07743 Jena, Germany

^cInstitut für Pharmakologie und Toxikologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Drackendorfer Straße 1, 07747 Jena, Germany

^dCollege of Pharmacy, King Saud University (KSU), P.O. Box 2457, Riyadh 11451, Saudi Arabia

*corresponding author : phone: +49 3641 94 98 00; fax: ++49 (0) 3641 94 98 02; e-mail: J.Lehmann@uni-jena.de

RECEIVED DATE (to be automatically inserted after your manuscript is accepted if required according to the journal that you are submitting your paper to)

Abstract. Serotonin and dopamine play an important role in the aetiology of schizophrenia. Combination of the structural scaffolds of both neurotransmitters in a single molecule led to aromatic annelated [*d,g*]azecines, which showed to be nanomolar to subnanomolar dopamine D₁-D₅ receptor antagonists. In this work the potential antipsychotic activity of azecine derivatives and related compounds was further characterized by radioligand binding experiments and conclusively confirmed *in vivo* (rats) by applying a conditioned avoidance model. The investigated azecines displayed affinities at human dopamine D₁-D₅ and serotonin 5-HT_{2A} receptors in a nanomolar range and low cytotoxicity. Their antipsychotic activities were comparable with those of haloperidol and risperidone, but revealed a two to five times better therapeutic range with regard to catalepsy. Preliminary tests for oral bioavailability also revealed promising results for this new class of antipsychotic compounds. In conclusion, aromatic annelated [*d,g*]azecines represent a novel class of substances with interesting qualities as potential atypical neuroleptics.

Keywords. azecines, antipsychotics, pole jump, CAR, catalepsy, locomotor activity, cytotoxicity, serotonin

Introduction

Due to a lack of efficacy and severe side-effects of the commonly used drugs, the treatment of schizophrenia is still a problem. In the last decades, since the first atypical antipsychotic drug was found, the focus of scientific research in schizophrenia moved step by step towards the use of multitargeting drugs with both dopamine and serotonin receptor affinities. Classical neuroleptics are predominantly dopamine D₂-receptor antagonists. They are very potent in treating positive symptoms, which are mainly caused by dopamine hyperfunction in the mesolimbic system. On the other hand, these drugs are not very useful to treat the negative symptoms and often produce intolerable extrapyramidal side effects, which are both, at least partially, caused by a dopamine hypofunction in special brain regions.^{4, 5} With the development of atypical neuroleptics, the hypotheses of an influence of serotonin on schizophrenia arose.⁶ It is not clarified yet, what influence serotonin has on the symptoms. One main hypothesis is an indirect connection of serotonin 2A receptor (5-HT_{2A}) antagonists on dopamine release in the mesocortex, which acts beneficially on the negative symptoms but may also affect the extrapyramidal side effects caused by dopamine antagonists.⁷ This theory is encouraged by the benefit of 5-HT_{2A} antagonists in some *in vivo* studies.⁸⁻¹¹ It was also shown previously, that additional 5-HT_{2A} receptor antagonism can enhance the potency of some D₂ receptor antagonists on positive symptoms.¹²

We have been interested in combining the structures of both neurotransmitters into a single molecule, thus achieving simultaneously high affinities for both, dopamine and serotonin receptors. The idea was to develop new

antipsychotic drugs with better therapeutic indices concerning positive symptoms and extrapyramidal side effects. Furthermore a beneficial influence on negative symptoms was supposed to be achieved.

Compound **1**, a hexahydrobenzindoloazecine (**Figure 1**), could be identified as highly active dopamine antagonist (nanomolar to subnanomolar *K_i*-values), whereas compounds **2** and **3** showed no affinities for dopamine receptors up to 10 μM.¹³

Lead structure optimization of aromatic annelated hexahydroazecines revealed as most favourable structure an indole or 3-substituted benzene as aromatic moiety and a methyl function at the basic nitrogen.¹³⁻¹⁵

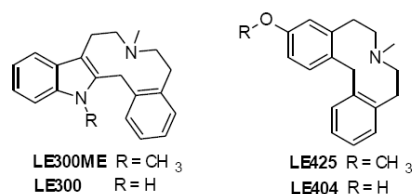


Figure 2. Compounds used in this study for *in vivo* investigations.

In the present study we determined the affinities of different hexahydrodibenz- and benzindoloazecines for serotonin 2A receptors and tested their toxicity on cultured human glia cells. Based on these results we selected four derivatives of the bisannellated hexahydroazecines, namely **LE300**, **LE300ME**, **LE404** and **LE425** with different dopamine receptor binding profiles for further investigations (**Figure 2**). It was examined, whether the high *in vitro* binding affinities of the azecines at the different dopamine and serotonin receptors result in high potencies in an animal model for positive symptoms. For this purpose,

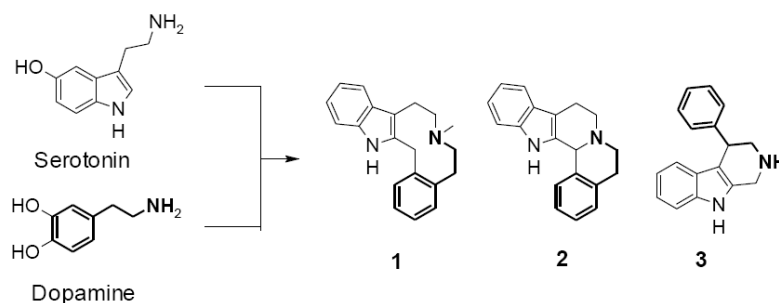


Figure 1. Lead structure development starting from the structural scaffolds of dopamine and serotonin.

inhibition of conditioned avoidance response (CAR) was used, which is considered a reliable test system for the identification of potential neuroleptics.^{16, 17} Catalepsy tests in rats were performed in order to measure the influence of the *in vitro* determined 5-HT_{2A} receptor affinities on extra-pyramidal side effects *in vivo*, caused by D₂ antagonism. In general, we wanted to estimate, whether the combination of dopamine and serotonin scaffolds to bisannulated hexahydroazecines has potential in the development of new antipsychotic drugs.

Results

Synthesis

In order to have the most possible variety of receptor subtype binding profiles, we included a newly developed compound with higher D₃ affinity compared to the other acezines in our investigations.

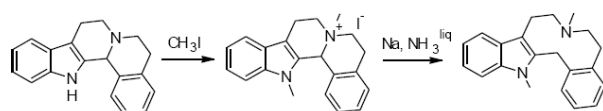


Figure 3. Synthesis of **LE300ME**

7,14-dimethyl-6,7,8,9,14,15-hexahydro-5H-indolo[3,2-f][3]benzazecine (**LE300ME**) is a new compound, prepared from 5,6,8,9,14,14b-hexahydroindolo[2',3',3,4]pyrido[2,1-a]isoquinoline by methylation with access of iodomethane in acetonitrile and cleavage of the C-N bond under *Birch* conditions (Na^o, NH₃^{liq}) (**Figure 3**). The crude product was purified by

column chromatography (EtOAc). Publication of the synthesis of **LE300ME** and related compounds in detail is in preparation by Robaa et al.

In vitro tests

Radioligand binding studies revealed for *N*-methyl substituted benzindolo- and dibenz[*d,g*]azecines in general nanomolar to subnanomolar affinities at 5-HT_{2A} receptors (data not shown). A summary of *K_i* values of the azecines **LE404**, **LE425**, **LE300** and **LE300ME** at dopamine and 5-HT_{2A} receptors is presented in **Table 1**. For all test compounds *EC*₅₀ values are in the nanomolar or subnanomolar range at all receptor subtypes. Compound **LE300ME** was newly developed as derivative with better D₃ affinity. Experiments on a functional calcium assay revealed that all investigated compounds act as antagonists at D₁, D₂, and D₅ receptors.

Cytotoxicity of several azecines was examined using an MTT-test on the human glia cell line U87. Incubation of compounds **LE404**, **LE425** and **LE300** with U87 cells did not reveal any cytotoxicity up to 250 μM (**Table 2**). Interestingly, all **LE300** derivatives with indole-*N* methylation revealed higher toxicity than **LE300** itself (data not shown), with lowest effects for **LE300ME**. For compound **LE300ME** only a very weak cytotoxicity was determined (*CC*₅₀=140 μM). Hence, a drug safety ratio of 1.000 was given for all drugs used in the *in vivo* experiments.

Table 1. Affinities of test compounds at dopamine D₁ – D₅ and serotonin 5-HT_{2A} receptors in radioligand binding experiments

substance	<i>K_i</i> [nM] ± SEM					
	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅	5-HT _{2A}
LE425	23.4±5.2 ^b	13.0±9.0 ^b	75.7±7.3 ^b	43.4±13.3 ^b	54±20.5 ^b	4.42±1.27
LE300	2.9±0.9 ^c	9.2±6.9 ^c	40.4±14.5 ^c	50.1±12.7 ^c	1.2±0.4 ^c	0.13±0.01
LE404	0.39±0.16 ^b	17.5±1.5 ^b	47.5±16.3 ^b	7.4±3.7 ^b	1.5±0.5 ^b	0.67±0.04
LE300ME	1.5±0.8	8.2±5.6	7.2±2.8	13.15±2.9	1.9±0.1	0.36±0.02
Risperidone	104±43 ^a	4.8±1.3 ^a	13.6±0.47 ^a	12.1±5.0 ^a	563 ^a	0.18±0.02 ^a
Haloperidol	3.4±1.8	0.28±0.26	0.18±0.03	3.5±0.89	4.2±0.3	103±21

^adata from PDSP database; ¹^bdata from Schulze et al.; ²^cdata from Hoefgen et al.³

Table 2. Cell viability \pm SD after drug administration (100 μ M) and calculated CC_{50} values (EC_{50} equivalent of cytotoxicity) tested on the human glia cell line U87

substance	Viability at 100 μ M [%]	CC_{50} [μ M]
LE425	118.7 \pm 4.8	>250 μ M
LE300	128.0 \pm 7.3	>250 μ M
LE404	120.7 \pm 0.5	>250 μ M
LE300ME	74.0 \pm 17.6	139.6 \pm 22.7

In vivo tests

Locomotor activity

Rats were exposed to an open field box 30 and 90 min after drug administration in order to observe changes in behaviour as a result of drug action. Line crossing (horizontal movement), rearing, grooming and defecation were analyzed separately. Grooming and defecation did not change significantly after drug administration. Horizontal and vertical movements revealed parallel dose response curves. Therefore, locomotor activities were measured as sum of both, crossing lines and rearing. Comparing the observations 30 and 90 min after drug administration, haloperidol (0.1, 0.2, 0.4 mg/kg), risperidone (0.125, 0.4, 0.5 mg/kg), **LE425** (2.0, 5.0, 10.0 mg/kg), **LE300** (1.0, 2.0, 5.0 mg/kg) and **LE300ME** (1.0, 2.0, 5.0 mg/kg) revealed no significant difference between both measurements ($p>0.05$). For **LE404** (0.5, 1.0, 2.0 mg/kg) measured locomotor activity was significantly less decreased after 90 minutes for all doses ($p<0.005$). Haloperidol ($F_{3,28}=29.21$, $p<0.001$), risperidone ($F_{3,28}=17.96$, $p<0.001$), **LE425** ($F_{3,28}=31.81$, $p<0.001$), **LE300** ($F_{3,28}=22.21$, $p<0.001$), **LE404** ($F_{3,28}=49.43$, $p<0.001$) caused reduced locomotor activity at all investigated doses compared to the control group.

Table 3. ED_{50} values and 95% confidence intervals (CI) of locomotor activity (vertical and horizontal movement)

substance	Locomotion ED_{50} [mg/kg]	95% CI
Risperidone	0.30	0.24 – 0.38
Haloperidol	0.10	0.04 – 0.25
LE425	2.09	1.21 – 3.61
LE404	0.41	0.34 – 0.64
LE300	0.74	0.58 – 0.93
LE300ME	1.72	1.22 – 2.41

LE300ME caused a significant decrease in locomotor activity at doses above 1mg/kg ($F_{2,21}=40.05$, $p<0.001$). ED_{50} values and 95% confidence intervals are outlined in **Table 3**. A figure containing the results of the test after 30 min is provided in the supporting information.

Pole Jump

Prior to drug testing, all rats were examined on stable conditioned avoidance response (CAR). Only rats which jumped onto the pole within 4 s in four out of five times were used for testing. There were no significant differences in reaction times ($p>0.05$) between the animals used in the experiments.

The results for both parts of the experiment (without and with current) are presented graphically for each drug in the supporting information. ED_{50} values and 95% confidence intervals are outlined in **Table 4**. For easier understanding, the part without electric foot-shock will in the following be termed as “part A”, and the one with foot-shock will be named “part B”.

Table 4. ED_{50} values and 95% confidence intervals (CI) of CAR in the pole jump experiment

substance	CAR ED_{50} [mg/kg]	95% CI
Risperidone	0.61	0.48 – 0.76
Haloperidol	0.20	0.16 – 0.24
LE425	2.51	1.91 – 3.31
LE404	0.32	0.22 – 0.46
LE300	0.94	0.78 – 1.14
LE300ME	0.71	0.60 – 0.85

Haloperidol was investigated over five doses in a range from 0.05 to 0.4 mg/kg body weight. The *Kruskal-Wallis-H* test revealed a significant inhibition of CAR ($p<0.001$) of the haloperidol treated animals compared to the saline injected group. Undertaking a *Mann-Whitney-U* test, followed by a *Bonferroni-Holm* correction for each dose, we identified 0.1, 0.15, 0.2 and 0.4 mg/kg as effective doses ($p<0.005$), whereas 0.05 mg/kg had no effect ($p>0.05$). Part B was conducted in order to investigate an unspecific impairment of the rats to undertake CAR. At 0.05, 0.1 and 0.15 mg/kg there was no increase of escape failures ($p>0.05$) whereas at doses of 0.2 and 0.4 mg/kg the impairment was significantly higher than in the control group ($p<0.01$). The

dose-dependent decrease in CAR as well as the appearance of non-reactions at doses of 0.2 and 0.4 mg/kg is shown in **Figure 4**.

Risperidone was examined in four different doses (0.25-0.75 mg/kg) and caused a dose dependent significant inhibition of CAR ($p < 0.001$). The investigated doses 0.25, 0.4, 0.5 and 0.75 mg/kg, reduced CAR significantly compared to the saline treated animals ($p < 0.05$). In Part B, CAR-inhibition was significantly increased at 0.4, 0.5, and 0.75, but not at 0.25 mg/kg. No significant impairment on escape behaviour was detected at any investigated dose ($p > 0.05$).

LE404 significantly increased CAR inhibition over all doses (range 0.1 - 2.0 mg/kg) shown by *Kruskal-Wallis-H* test ($p < 0.005$). Whereas 0.1 mg/kg revealed no difference compared to the control group (Mann-Whitney-U, $p > 0.05$), a significant enhancement of reaction time compared to the control group was measured for 0.3, 0.5, 1.0 and 2.0 mg/kg ($p < 0.001$). In part B significant CAR-inhibition could be observed for 0.3 - 2.0 mg/kg. An impairment of escape behaviour was only significant for 0.5, 1.0 and 2.0 mg/kg ($p < 0.05$), but not below 0.5 mg/kg ($p > 0.05$).

Administration of **LE300ME** generated significantly enhanced reaction times at all investigated doses ($p < 0.01$): 0.5 – 2 mg/kg. In part B, at a dose of 0.5 mg/kg CAR-Inhibition could not be observed ($p > 0.05$). All other investigated doses, produced a significant reduction of CAR ($p < 0.001$). Increase of non-reaction was observed at doses equal to or higher

than 1.0 mg/kg ($p < 0.001$).

LE425 showed a dose dependent and significant increase in reaction times in a range from 0.5 to 5.0 mg/kg ($p < 0.001$). At a dose of 0.5 mg/kg neither an increase in reaction time in part A ($p > 0.05$), nor a significant inhibition of CAR in part B ($p > 0.05$) was observed compared to the control group. For all other doses investigated, starting with 1 mg/kg, enhancement of reaction time and inhibition of CAR were significant ($p < 0.01$). A significant non-reaction occurred only at 3 and 5 mg/kg ($p < 0.05$).

LE300 was investigated in five different doses ranging from 0.3 to 2.0 mg/kg body weight and showed a dose dependent and significant increase in reaction time over all doses in the *Kruskal-Wallis-H* test ($p < 0.001$). At a dose of 0.3 mg/kg body weight no significant difference compared to the control group was observed ($p > 0.5$), whereas all doses between 0.5 and 2.0 mg/kg caused a significant enhancement of reaction time compared to the animals treated with saline solution ($p < 0.05$). In part B, all doses influenced CAR significantly ($p < 0.05$). An impairment of the escape behaviour occurred above 2.0 mg/kg ($p < 0.001$).

Catalepsy

Results of bar and cross-leg tests 30 min after drug administration are shown in **Figure 4**. All investigated compounds, including the standards haloperidol and risperidone, caused catalepsy, stably expressed between 30 and 90 min after drug administration.

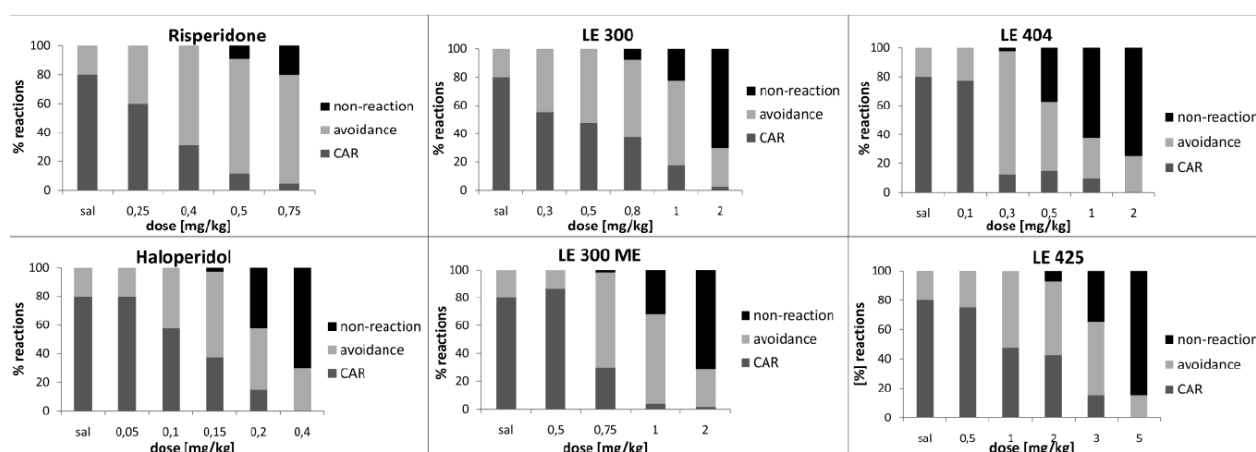


Figure 4. Effects of test compounds in the pole jump task with current after 4 s; percentage of jumps within 4s (CAR), after 4s (avoidance) and no jump within 20s (non-reaction).

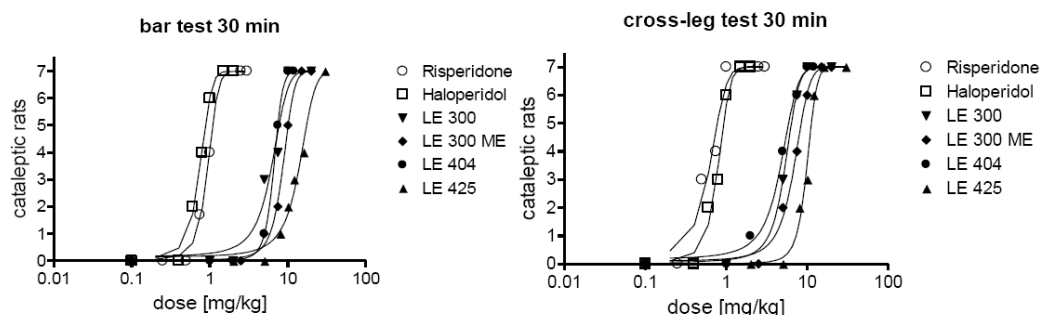


Figure 5. Dose-dependence of bar test and cross-leg test 30 min after drug administration. Rats ($n = 7$ per dose) which remained ≥ 90 s in an awkward position were counted as cataleptic.

However, these effects occurred at much higher doses compared to effects on CAR. ED_{50} values and 95% confidence intervals [mg/kg] are as follows: bar test: haloperidol 0.73 (0.68-0.79), risperidone 0.90 (0.76-1.05), **LE425** 13.92 (12.91-15.01), **L404** 6.54 (5.76-7.42), **LE300** 8.84 (7.64-10.24), **LE300ME** 8.68 (8.27-9.09); cross-leg test: haloperidol 0.78 (0.70-0.87), risperidone 0.97 (0.87-1.08), **LE425** 12.25 (11.57-12.97), **LE404** 6.12 (6.11-6.12), **LE300** 7.17 (6.18-8.31), **LE300ME** 6.16 (4.22-8.97).

$30.1 \pm 2.1\%$ at this dose, not enhanced by variation of the pre-treatment time (30 to 90min). Further dose-increase of **LE404** to 5 mg/kg body weight ($n=8$ rats) led to similar results (**Figure 6**). Only three out of 8 rats were affected at this higher dose, with enhanced CAR-inhibition rate of $80.9 \pm 8.8\%$. At a dose of 20 mg/kg ($n=5$), all investigated animals showed CAR-inhibition of $94.1 \pm 4.5\%$. Three out of five rats displayed catalepsy at this dose (bar test).

Oral bioavailability

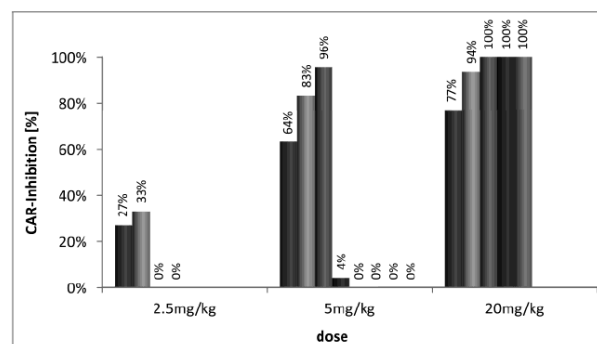


Figure 6. Oral bioavailability of **LE404** at different doses measured in the pole jump test as percentage of CAR-inhibition (each bar represents one rat).

In order to examine the oral bioavailability of the investigated azecines, 2.5 mg/kg of **LE404** and **LE300ME** were administered per os to four rats each and the treated animals were exposed to the pole jump test 45 min (**LE404**) or 60 min (**LE300ME**) after drug administration. At this dose **LE300ME** revealed a $74.5 \pm 19.2\%$ CAR-Inhibition. All rats were significantly influenced ($p=0.004$) by the drug (data not shown). **LE404** could only induce in two rats CAR-inhibition of

Discussion

Dopamine antagonists are well known to be very potent drugs against positive symptoms of schizophrenia, but often cause therapy limiting side effects. Parkinson like symptoms, often induced by these drugs, are considered to be reduced by serotonin antagonism. The bisannellated hexahydroazecines described in this study, were designed to combine both, potency against positive symptoms by dopamine antagonism and reduced side effects by serotonin antagonism in one drug. This class of new substances revealed some nanomolar antagonists at human dopamine (D_1 - D_5) receptors. In the current work, we investigated these potential antipsychotics also at human 5-HT_{2A} receptors, measured their cytotoxic effects and the efficacy *in vivo*.

For the *in vivo* investigations, we selected four hexahydroazecine derivatives, namely **LE300**, **LE300ME**, **LE404** and **LE425**, based on the results of *in vitro* tests. Besides the high affinities for dopamine and 5-HT_{2A} receptors, a low general cytotoxicity of the compounds was a basic requirement for the selection. All investigated compounds showed nanomolar

affinities to D₁ – D₅ and 5-HT_{2A} receptors and CC₅₀ values on human glia cells in cytotoxicity assays above 100 µM.

Previous studies have shown that all clinical relevant neuroleptic compounds inhibit selective conditioned avoidance response (CAR) at doses that do not influence the natural escape behavior.¹⁷ The suppression of CAR in rats has a high predictive validity for antipsychotic potency.¹⁸ Therefore we studied the neuroleptic like potency of our four test compounds by a one-way active avoidance task in the pole jump model.

In our experiments, haloperidol and **LE404** were equally potent in CAR inhibition and **LE300ME** was as potent to reduce CAR as risperidone. **LE300** and **LE425** showed the same effects, but only at higher doses. All tested bisannellated hexahydroazecines were potent to inhibit CAR at doses, at which the escape behaviour was not restrained. From these results we conclude that the tested azecines have a high likelihood of neuroleptic potency to treat positive symptoms of schizophrenia.

It might be argued, that the effect of CAR is only a consequence of reduced locomotor activity. The measured locomotor activity was indeed decreased by all test compounds. However, the calculated ED₅₀ values of the locomotor activity do only correlate moderately with the suppression of CAR ($r^2=0.65$, $p=0.05$). Some mild correlation is reasonable, due to the fact that both, locomotor activity and antipsychotic efficacy are at least partially caused by the same mechanism – dopamine antagonism. Nevertheless, there are published examples, where CAR inhibition occurs at doses, at which the locomotor activity is not influenced.¹⁹ In the present study **LE300ME** showed significantly

less reduction in locomotor activity than effect on CAR.

Next to the improvement of symptoms, a high therapeutic range regarding side effects is a major demand on new neuroleptics. Extra-pyramidal movement disorders are some of the most common adverse side-effects of antipsychotics and are often therapy limiting. Therefore we examined the induction of catalepsy, a reliable animal model for these Parkinson like symptoms for all test substances. Haloperidol shows catalepsy at very low doses (<1mg/kg), while ED₅₀ values of the investigated azecines range between 6 and 16mg/kg body weight. It could be observed, that **LE404** had a 5-fold broader therapeutic range than the investigated standard compounds regarding catalepsy (compare **Tab 5**). **LE300** and **LE300ME** revealed minor advantages compared to haloperidol at risperidone in the catalepsy-potency-ratio. It is remarkable, that risperidone, an often prescribed atypical antipsychotic, does not show advantages over haloperidol in this model. Nevertheless, risperidone itself is mainly used because of its equally effects on negative and positive symptoms. The occurrence of extra-pyramidal side effects (EPS) in patients at higher doses of risperidone is well known. In several studies clinical titrated doses of haloperidol at risperidone showed no significant difference in the occurrence of EPS.^{20, 21}

The standard compounds haloperidol and risperidone are accepted and commonly used drugs in the treatment of schizophrenia. Regarding the receptor binding profile, the typical antipsychotic haloperidol displayed high binding affinities to all dopamine receptors, but selectivity for the D₂ and D₃ receptors. It shows only very low affinity to the 5-HT_{2A} receptor.

Table 5. ED₅₀ values of the *in vivo* tests and determination of the catalepsy (CAT/CAR-inhibition ratio)

substance	Locomotor activity ED ₅₀ [mg/kg]	CAT (bar) ED ₅₀ [mg/kg]	CAT (CLP) ED ₅₀ [mg/kg]	CAR ED ₅₀ [mg/kg]	CAT/CAR
Risperidone	0.3	1.2	1.1	0.61	1.8 – 2.0
Haloperidol	0.1	0.7	0.8	0.20	3.5 – 4.0
LE425	2.1	13.9	7.2	2.51	2.8 – 5.5
LE404	0.4	6.5	4.3	0.32	13.4 – 20.3
LE300	0.7	8.8	7.2	0.94	7.7 – 9.4
LE300ME	1.7	8.3	6.2	0.71	8.7 – 11.7

CAT (bar) –catalepsy (bar test); CAT (CLP) – catalepsy (cross-leg-position test); CAR – conditioned avoidance response

Risperidone as an example for atypical antipsychotics showed selectivity to the D₂, D₃, D₄ receptors, but also high affinities for the 5-HT_{2A} receptor in a subnanomolar range. **LE300**, **LE404** and **LE425** revealed affinities for the 5-HT_{2A} receptor comparable with those of risperidone, but higher affinities for D₁ and D₅. **LE404** displayed the highest affinities and selectivity for the D₁ receptor, whereas **LE300** and **LE300ME** were equally potent at D₁ and D₅. **LE425** showed highest affinities for the D₂ receptor, though no selectivity for any receptor subtype. All of our compounds except **LE300ME** were comparably less active at the D₃ receptor and **LE425** and **LE300** showed lower affinities to D₄ than the other compounds including the standards. These different subreceptor affinities and selectivities should enable us to investigate the influence of the different dopamine receptor subtypes and the 5-HT_{2A} receptor on potency against positive symptoms and induction of catalepsy. Using the results from open field tests (locomotor activity), pole jump tests (CAR-inhibition, antipsychotic potency) and bar tests (catalepsy), we tried to correlate the data of the *in vitro* receptor binding studies with the ones obtained in animal models *in vivo*. A distinct correlation between the affinities for a single receptor subtype to the ED₅₀ values of the different animal tests could not be found ($p > 0.05$). Best results, but with only very weak correlation were observed for D₂/locomotor activity ($r^2 = 0.71$, $p = 0.22$), D₄/CAR-inhibition ($r^2 = 0.63$, $p = 0.59$) and D₂/catalepsy ($r^2 = 0.64$, $p = 0.16$). Because these results may be influenced by the small amount of correlated data, further hexahydrodibenz- and -benzindoloazecines should be examined to support the results. Nevertheless, our observations are in line with the theory discussed in literature, that one receptor alone cannot be fully responsible for the observed *in vivo* results.²²⁻²⁴ Surprisingly there was a strong and significant correlation between the CAT/CAR ratio and D₁ ($r^2 = 0.95$, $p = 0.03$) or D₅ receptors ($r^2 = 0.96$, $p = 0.03$), which could imply an advantage of high affinities to the D₁ receptor family, displayed by almost all hexahydrodibenz- and -benzindoloazecines. Some formerly postulated correlation between 5-HT_{2A} receptor affinities and catalepsy²⁵ or CAT/CAR-ratio, respectively, could not be found

for the tested compounds ($p > 0.5$). This missing correlation indicates, that the 5-HT_{2A} receptor affinity might not be responsible for less extrapyramidal side-effects as discussed by Kapur et al.²² Further investigations on bisannellated hexahydroazecines should therefore concentrate on the influence of the additional 5-HT_{2A} affinities on negative symptoms. Due to the possible dopamine release into the prefrontal cortex by 5-HT_{2A} receptor blockade, the dopamine hypofunction in this region, postulated as crucial for negative symptoms, might be reduced.²⁶ Comparison of the single test compounds one to another, reveals that the compounds with almost the same affinities to D₂ receptors (e.g. **LE404** and **LE425**) showed completely different activities in the animal experiments. Either the lower D₁, D₅ or lower 5-HT_{2A} receptor affinities could be responsible for the different results with compound **LE425**.

Beside the therapeutic effect itself and few side effects, oral bioavailability is a basic requirement for antipsychotic drugs. We investigated one example of both scaffolds (hexahydrodibenz- and -benzindolo[*d,g*]azecines) by oral administration in the pole jump test. The hexahydrobenzindoloazecine **LE300ME** showed constantly good results at the investigated dose of 2.5 mg/kg (79.6% CAR-inhibition). All rats were influenced at this dose ($n = 4$). Results for the hexahydrodibenzazecine **LE404** were more difficult to interpret. Some rats showed distinct inhibition of CAR at 2.5 and catalepsy at 20 mg/kg, whereas other rats showed CAR-inhibition only at 20 mg/kg with no effect on escape behaviour or catalepsy. Hence, we assume that the oral bioavailability of **LE404** may be inter-individually different. Though we cannot explain this observation so far, an influence of the phenolic hydroxy function of this substance on oral bioavailability is conceivable.

Conclusion

Aromatic annellated hexahydro[*d,g*]azecines represent a novel and advantageous type of potent neuroleptics. They were investigated with respect to serotonin receptor affinity, cytotoxicity, *in vivo* antipsychotic potency (pole jump test, CAR), extra-pyramidal side effects (catalepsy) and oral bioavailability. Four examples of this

substance class, each with different selectivity profile to dopamine receptors, were selected for the experiments. All of them proved to be potent antipsychotics. **LE404** and **LE300ME** revealed activities against positive symptoms comparable to the standard compounds haloperidol and risperidone. **LE300** and **LE425** showed the same effects on CAR albeit at higher doses. The tested azecines caused catalepsy only at significantly higher doses than haloperidol and risperidone. Hence, three of the four substances revealed a beneficial therapeutic range compared to the standard compounds regarding extra-pyramidal side effects. **LE404** and **LE300ME**, the best compounds in this study, were about 3-6 times better than haloperidol or risperidone. In addition we investigated the oral bioavailability of these two most promising compounds. **LE404** displayed a heterogeneous result when administered orally, most probably due to the phenolic function. Only some of the animals behaved as expected, while others needed a much higher dose for the same outcome. However, compound **LE300ME** showed constant CAR-inhibition already at low doses after oral administration. We conclude that the investigated azecines represent a class of substances with interesting characteristics of potential neuroleptics. Beside the high dopamine (D₁-D₅) and serotonin receptor (5-HT_{2A}) affinities and low cytotoxicity, these compounds showed high potency against positive symptoms *in vivo*, less extra-pyramidal side effects than risperidone and probably acceptable oral bioavailability. After intense investigations on hexahydrodibenz- and benzindoloazecines at human dopamine receptors and some first hints on 5-HT_{2A} antagonism by measurements on pic arteries in the past, it could be proved for the first time that this class of substances revealed some highly potent antagonists at human 5-HT_{2A} receptors with low cytotoxicity and *in vivo* potency.

Experimental Section

Substances

Haloperidol was obtained by GRY-Pharma, Kirchzarten, Germany, Risperidone by the U.S. Pharmacopeia, Rockville, USA. **LE404** (7-methyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo-*[d,g]*azecine-3-ol) and **LE425** (3-methoxy-7-

methyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo-*[d,g]*azecine) are known from Mohr et al.¹⁵. **LE300** (7-methyl-6,7,8,9,14,15-hexahydro-5*H*-indolo[3,2-*f*][3]benzazecine) was first described by Witt et al.¹³ These compounds were available in the lab from previous work and conformed the requirements of >95% purity.

LE300ME (7,14-dimethyl-6,7,8,9,14,15-hexahydro-5*H*-indolo[3,2-*f*][3]benzazecine) Publication of the synthesis of this and related compounds by Robaa et al. is in preparation.

The melting point is uncorrected and was measured in open capillary tubes, using a Gallenkamp melting point apparatus. ¹H NMR spectral data were obtained from a Bruker Advance 250 spectrometer (250 MHz). Elemental analyses were performed on a Hereaus Vario EL apparatus and MS data were determined by GC/MS, using a Hewlett Packard GCD-Plus (G1800C) apparatus (HP-5MS column; J&W Scientific).

Purified by column chromatography (EtOAc). Yellow powder. Mp. 103-105°C. ¹H-NMR 400 MHz (CDCl₃): δ 2.35 (s, 3H, N-Me), 2.45-2.48 (t, *J* = 6Hz, 2H, 5), 2.70-2.73 (t, *J* = 6Hz, 2H, 9), 2.76-2.81 (mc, 4H, 6, 8), 3.56 (s, 3H, indole N-Me), 4.54 (s, 2H, 15), 7.04-7.08 (dd, *J* = 7, 1Hz, 1H, 11), 7.10-7.12 (dd, *J* = 7, 1Hz, 1H, 4), 7.16-7.21 (m, 3H, 2, 3, 12), 7.24-7.26 (d, *J* = 8Hz, 1H, 13), 7.32-7.33 (dd, *J* = 8, 3Hz, 1H, 10), 7.50-7.52 (d, *J* = 8Hz, 1H, 1). GCMS: m/z: 304 (21%), 260 (9%), 246 (53%) 232 (100%), 217 (63%) 200 (17%), 168 (10%), 157 (47%), 144 (55%), 128 (38%), 115 (88%), 104 (61%), 91 (41%), 77 (78%), 63 (34%). Anal. calc. for C₂₁H₂₄N₂ x 0.2 EtOAc: N 81.30%; H 8.01%; N 8.70%; found N 81.56%; H 8.30%; N 8.89%.

In vitro tests

Assays with dopamine and serotonin receptors

Radioligand binding experiments and a functional calcium assay were performed as described previously.² In addition to the human dopamine receptor subtypes D₁, D_{2L}, D₃, D_{4.4} and D₅, we established a radioligand binding assay for human cloned 5-HT_{2A} receptors. Human 5-HT_{2A}, D₁, D_{2L}, D₃, and D₅ receptors were stably expressed in human embryonic kidney cells (HEK293) and D_{4.4} receptors in Chinese hamster ovary cells (CHO), respectively. A serotonin 5-

HT_{2A} expressing cell line was kindly provided by M. U. Kassack (University of Düsseldorf, Germany).

Cell culture

Cells were grown at 37°C under an atmosphere of 5% CO₂: 95% air in HAM/F12-medium (Sigma–Aldrich, Germany) for CHO cells and Dulbecco's Modified Eagles Medium Nutrient Mixture F-12 Ham (Sigma–Aldrich, Germany) for HEK293 cells, each supplemented with 10% foetal bovine serum, 1mM L-glutamine and 0.2µg/mL of G 418 (all from Sigma–Aldrich, Germany).

Radioligand binding experiments

Radioligand binding studies were performed using a whole cell suspension in tris-HCl buffer (pH 7.4). [³H]SCH23390 (Amersham, UK), was used as radioligand for the D₁ and D₅ receptor binding experiments, and [³H]spiperone (Amersham, UK) for 5-HT_{2A}, D_{2L}, D₃ and D_{4.4} receptors. Non-specific binding was determined using fluphenazine (Promonta, Germany) (100µM) for D₁, D₅ and 5-HT_{2A} receptors and haloperidol (GRY-Pharma, Germany) (10µM) for D_{2L}, D₃, and D_{4.4} experiments. The test compound (dilutions for final concentrations between 100µM and 1pM) and the radioligand were added to the cell suspension and the mixture was incubated at 27°C for 90 minutes using a thermocycler (Thermocycler comfort®, Eppendorf, Germany). Experiments were carried out in 96 well format (Greiner bio-one, Germany) in a final volume of 550µL per well. For determining the *K_i* values, at least two independent experiments each in triplicate were performed. The competition binding data were analyzed with GraphPad Prism™ 3.0 software using nonlinear regression with sigmoidal dose response equation. *K_i* values were calculated applying the equation of Cheng and Prusoff.²⁷

Functional calcium assay

Screening for agonistic and antagonist activity was performed in an intracellular calcium assay using a NOVOstar microplate reader™ (BMG Lab Technologies) with a pipettor system. Agonistic activities were tested by injecting 20µL buffer alone as negative control, standard agonist in buffer as positive control (final concentration:

1 µM), and test compounds in buffer in rising concentrations, respectively, each into separate wells. Screening for antagonist activities was performed by pre-incubating the cells with 20µL of the test compound dilutions (final concentrations: 100 µM, 50 µM, 10 µM, 5 M, 1 µM, 500 nM, 100 M, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 0,1 nM) at 37 °C 30 min prior to injection of 20 µL standard agonist per well. Fluorescence measurement started simultaneously to the automatic injection. SKF38393 (Sigma–Aldrich, Germany) was used as standard agonist for D₁ and D₅ receptors and quinpirole (Sigma–Aldrich, Germany) for D_{2L} receptors. At least two independent experiments, each in four or six replications, were performed. Fluorescence intensity was measured at 520 nM (bandwidth 25nM) for 30 s at 0.4 s intervals. Excitation wavelength was 485 nM (bandwidth 20 nM). Agonistic or antagonist activities were assessed by a dose response curve, obtained by determination of the maximum fluorescence intensity of each data set and nonlinear regression with sigmoidal dose response equation using Graph Pad Prism TM 3.0.

Cytotoxicity - MTT-test

U87-MG glia cells (HTB-14; ATCC, USA) were cultured at 37°C, and 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) (PAA, Austria) + 10% Foetal calf serum (FCS) (Thermo Scientific HyClone, UK). In 96 well plates 15,000 cells were dispersed in 200 µL into each well. After 24 hours the medium was replaced by DMEM + FCS containing the test compound solved in 0.25% DMSO (final concentration). To minimize edge-effects as mentioned by Rasmussen,²⁸ each concentration of each compound was measured in 6 wells distributed across the 96 well plate and only the inner 6x10 wells of the plate were analyzed. The outer wells were filled with 200 µL PBS-buffer. As positive control, 6 wells with cells and medium containing 0.25% DMSO were analyzed. After 24 hours of incubation, the medium was removed and 100 µL MTT (Fluka, Germany), dissolved in phenol red-free DMEM (without FCS) at 0.5 mg/mL, were added to each well. The plates were incubated for 4 hours. By addition of 100 µL of 20% sodium dodecyl sulphate (SDS), followed by incubation overnight at 37°C, all

cells were killed and formazan crystals were solubilised. Optical density was measured at 544 nM using a microplate reader (Galaxy FluoStar, BMG Lab technologies) with background subtraction (compounds in the same preparation without cells). Cytotoxicity values were calculated as percentage of positive control (= 100%). CC_{50} values were determined with Graph Pad Prism TM 3.0. All experiments were repeated at least three times independently.

In vivo tests

Animals

Female Han-Wistar rats, aged 8 weeks and weighing between 120 and 160 g at the beginning of the experiments, were used for the pole jump experiments and the locomotor activity tests. For the catalepsy test we used rats aged 4-8 months, weighing between 200 and 280 g. Animals were kept under controlled laboratory conditions (dark-light cycle 12:12h, temperature $23 \pm 2^\circ\text{C}$, air humidity 55-60%). They were housed in groups of four animals with free access to commercial food (Altromin 1326) and tap water. The permission of the animal protection commission of the State of Thuringia was given.

Administration of Substances

Haloperidol, **LE404**, **LE425**, **LE300** and **LE300ME** were converted into hydrochlorides and dissolved in isotonic saline solution. Risperidone was used as free base, dissolved in isotonic saline solution with two drops of Tween 80. The pH was adjusted to 5 - 7.

In all experiments, except the oral bioavailability tests, 1 mL/100 g body weight was injected intra-peritoneally. Pre-treatment time for haloperidol and the new test compounds **LE400**, **LE425**, **LE300** and **LE300ME** was 30 min. According to literature pre-treatment time for risperidone was 60min for the pole jump experiment.¹⁹ The control groups received saline solution only.

For oral bioavailability, examined in the pole jump test, **LE404** and **LE300ME** were administered by oral gavage. Four rats were treated with 2.5 mg/kg body weight of the substances, dissolved in saline solution (0.5 mL/200 g body weight). Further investigations on **LE404** were performed on 13 animals (5 mg/kg on 8 rats, 20 mg/kg on 5 rats).

Testing

After a short handling period in which the rats were in close contact with the laboratory staff, at an age of 30 days, all rats were habituated to the experimental equipment and the operator 10min per day over 10 days. Trainings and experiments were performed between 7:00 a.m. and 3:00 p.m.

Locomotor activity

Horizontal and vertical movements of the rats (n=8 per dose) were observed in an open field box (50 cm x 50 cm x 50 cm) over 5 min. The bottom of the box was divided into 25 equal quarters. Rats were placed in the middle of the box. Line crossing, rearing on the edge /in the middle, grooming and defecation was counted individually over the whole time. The illumination in the test room was stable at 30 lx. The open field box was cleaned with Descosept AF (Schumacher, Melsungen, Germany) and wiped after each test. Dose response curves were generated with Graph Pad PrismTM 3.0.

Catalepsy

Catalepsy was measured in two different test systems: the cross-leg-position (CLP) and the bar test⁹ with 7 rats per dose. In the bar test, 30 and 90 min after drug administration, animals were placed with their forepaws on a wooden bar, which was 10 cm high. The time was measured, during which the rat remained in this position. Immediately after the bar test, the rats were exposed to the CLP test, where one of the hind limbs was placed over the forepaw and time was measured during which the rat remained immobile. Rats, which stayed in the awkward position longer than 90 s were estimated as cataleptic. Dose response curves and ED_{50} values could be obtained by plotting the amount of cataleptic rats against the individual dose by Graph Pad PrismTM 3.0.

Pole Jump

Rats were entrained daily to jump onto a pole when a white noise signal (1000 Hz, 50 dB, conditioned stimulus, CS) was presented, in order to avoid an electric foot-shock (0.2 mA, unconditioned stimulus, UCS), which was given additionally to the noise after 4 s. Maximum trial duration was 20 s. Animals were exposed to 10 trials every day until they showed stable

conditioned avoidance response (CAR). Stable CAR was defined by at least eight out of ten jumps within 4 s after presentation of the white noise. Only rats with at least 6 days of training and a stable CAR over the last two days were used for the experiments.

Rats were applied to the experiment with different concentrations of one substance in randomized order. Between the experiments each rat had a seven day wash out period including training every day.

Drug tests consisted of three steps according to literature.¹⁹ First, the stable CAR of each rat was verified within 5 trials with conditioned and unconditioned stimulus as described above. Only rats which jumped in four out of five trials within 4 s (stable CAR) were used for the further experiment.

After administration of the test compounds and keeping the pre-treatment time, the animals were exposed to the pole jump apparatus again. Within 10 trials only the CS, but not the electric foot-shock (UCS) was presented and the time was measured until the rat jumped onto the pole. Each trial was stopped after 20 s. Between each trial a predefined interval of 30 to 90 s (mean intertrial interval 60 s) was kept. A reduced CAR in this experiment is considered as antipsychotic activity of the administered drug. Reaction times were integrated over time. Determination of the area under the curve (AUC) values was performed by Graph Pad Prism™ 3.0. Out of these AUC values for each rat, a dose response curve could be obtained and ED_{50} values determined.

Immediately after the 10 trials only with CS, five trials were performed where the CS-UCS combination was used again. Time was measured until the rats jumped onto the pole. This step should differentiate between the inhibition of CAR as known for antipsychotic drugs and unspecific motor impairments caused by the administered drugs. Based on reaction times the percentage of conditioned avoidance reaction, avoidance reaction and non-reaction was determined.

Statistics

All in vitro experiments were at least performed twice independently. The outlined results are mean values \pm SEM (SD for MTT test), calculated by Microsoft Office Excel®

2007. In vivo results were analysed by SPSS Statistics® 17.0. Locomotor activity measurements were subjected to ANOVA followed by post hoc analyses with Bonferroni test. Catalepsy was analysed based on the times the rats remained in the awkward position by ANOVA. CAR times in the pole jump test could not be examined by ANOVA, since the test was stopped at 20 s and there was no normal distribution between the measured times. Hence, nonparametric tests were performed. The significance over all experiments was determined by a Kruskal-Wallis-H test and the differences between the different doses to saline solution were examined by Mann-Whitney-U tests, followed by Bonferroni-Holm correction. Significance between occurrences of non-reactions at different doses was calculated by χ^2 - and two-sided Fisher test. For correlations calculated according to Pearson with two-sided significance, all values were converted into mol units, calculated for the free base. Significance was set at $p < 0.05$.

Acknowledgment The authors would like to thank Anne Berthold and Anne-Katja Imhof for the expert assistance in drug administration.

Supporting Information Available: Figures of the pole jump and locomotor activity experiments are available online at <http://pubs.acs.org>.

References

1. PDSP, 2010.
2. Schulze, M.; Muller, F. K.; Mason, J. M.; Gorts, H.; Lehmann, J.; Enzensperger, C. *Bioorg Med Chem* **2009**, *17*, 6898.
3. Hoefgen, B.; Decker, M.; Mohr, P.; Schramm, A. M.; Rostom, S. A.; El-Subbagh, H.; Schweikert, P. M.; Rudolf, D. R.; Kassack, M. U.; Lehmann, J. *J Med Chem* **2006**, *49*, 760.
4. Knable, M. B.; Egan, M. F.; Heinz, A.; Gorey, J.; Lee, K. S.; Coppola, R.; Weinberger, D. R. *Br J Psychiatry* **1997**, *171*, 574.
5. Abi-Dargham, A.; Laruelle, M. *Eur Psychiatry* **2005**, *20*, 15.
6. Moller, H. J. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **1999**, *249 Suppl 4*, 99.
7. Ichikawa, J.; Meltzer, H. Y. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **1999**, *249 Suppl 4*, 90.

8. Kehne, J. H.; Baron, B. M.; Carr, A. A.; Chaney, S. F.; Elands, J.; Feldman, D. J.; Frank, R. A.; van Giersbergen, P. L.; McCloskey, T. C.; Johnson, M. P.; McCarty, D. R.; Poirot, M.; Senyah, Y.; Siegel, B. W.; Widmaier, C. *J Pharmacol Exp Ther* **1996**, 277, 968.
9. Kleven, M.; Prinssen, E. P.; Koek, W. *Eur J Pharmacol* **1996**, 313, 25.
10. Meltzer, H. Y.; Matsubara, S.; Lee, J. C. *J Pharmacol Exp Ther* **1989**, 251, 238.
11. Prinssen, E. P.; Colpaert, F. C.; Koek, W. *Eur J Pharmacol* **2002**, 453, 217.
12. Wadenberg, M. G.; Browning, J. L.; Young, K. A.; Hicks, P. B. *Pharmacol Biochem Behav* **2001**, 68, 363.
13. Witt, T.; Hock, F. J.; Lehmann, J. *J Med Chem* **2000**, 43, 2079.
14. Kassack, M. U.; Hofgen, B.; Decker, M.; Eckstein, N.; Lehmann, J. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **2002**, 366, 543.
15. Mohr, P.; Decker, M.; Enzensperger, C.; Lehmann, J. *J Med Chem* **2006**, 49, 2110.
16. Arnt, J. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* **1982**, 51, 321.
17. Wadenberg, M. L.; Hicks, P. B. *Neurosci Biobehav Rev* **1999**, 23, 851.
18. Kuribara, H.; Tadokoro, S. *Pharmacol Biochem Behav* **1981**, 14, 181.
19. Becker, A.; Grecksch, G. *Behav Brain Res* **2008**, 186, 155.
20. Ceskova, E.; Svestka, J. *Pharmacopsychiatry* **1993**, 26, 121.
21. Chouinard, G.; Jones, B.; Remington, G.; Bloom, D.; Addington, D.; MacEwan, G. W.; Labelle, A.; Beauclair, L.; Arnott, W. *J Clin Psychopharmacol* **1993**, 13, 25.
22. Kapur, S. *Psychopharmacology (Berl)* **1996**, 124, 35.
23. Wadenberg, M. L.; Soliman, A.; VanderSpek, S. C.; Kapur, S. *Neuropsychopharmacology* **2001**, 25, 633.
24. Richtand, N. M.; Welge, J. A.; Logue, A. D.; Keck, P. E., Jr.; Strakowski, S. M.; McNamara, R. K. *Prog Brain Res* **2008**, 172, 155.
25. Balsara, J. J.; Jadhav, J. H.; Chandorkar, A. G. *Psychopharmacology (Berl)* **1979**, 62, 67.
26. Davis, K. L.; Kahn, R. S.; Ko, G.; Davidson, M. *Am J Psychiatry* **1991**, 148, 1474.
27. Cheng, Y.; Prusoff, W. H. *Biochem Pharmacol* **1973**, 22, 3099.
28. Rasmussen, T. H.; Nielsen, J. B. *Biomarkers* **2002**, 7, 322.

Supporting Information

Molecular Combination of the Dopamine and Serotonin Scaffolds Yield in Novel Antipsychotic Drug Candidates – Characterization by in vivo Experiments

Maria Schulze, Oliver Siol, Dina Robaa, Franziska K. U. Mueller, Christian Fleck and Jochen Lehmann

The supporting information contains graphical illustrations of the results of the pole jump experiments and the in vivo investigations on locomotor activity.

Figure 1: Effects of the test compounds on the one-way CAR in rats. Trials 1-5: before drug administration, plus current after 4s (control of stable CAR); trial 6-15, part A: after drug administration, without current, measurement of CAR inhibition; trial 16-20, part B: after drug administration, plus current after 4s, determination of non-reaction. Means \pm SEM.; n = 8.

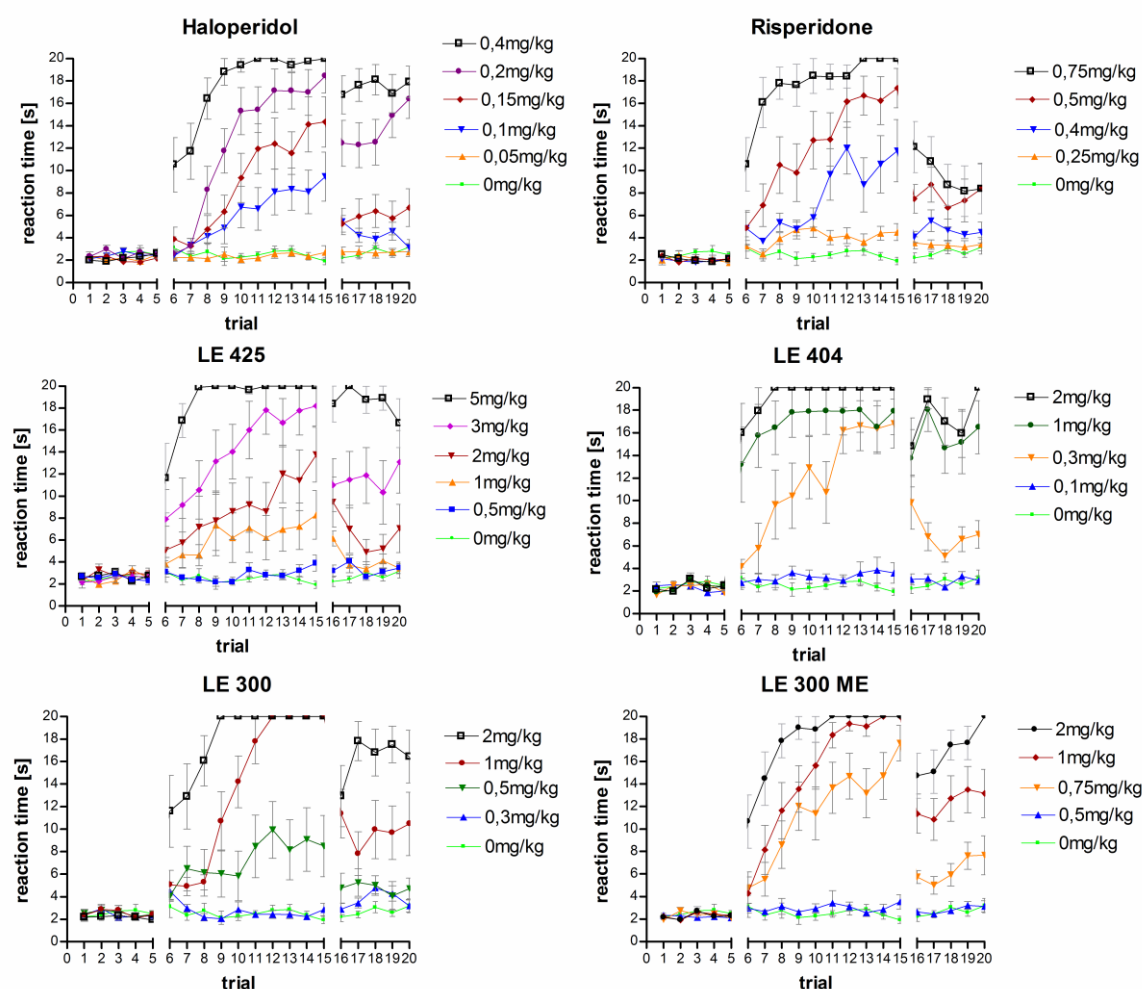
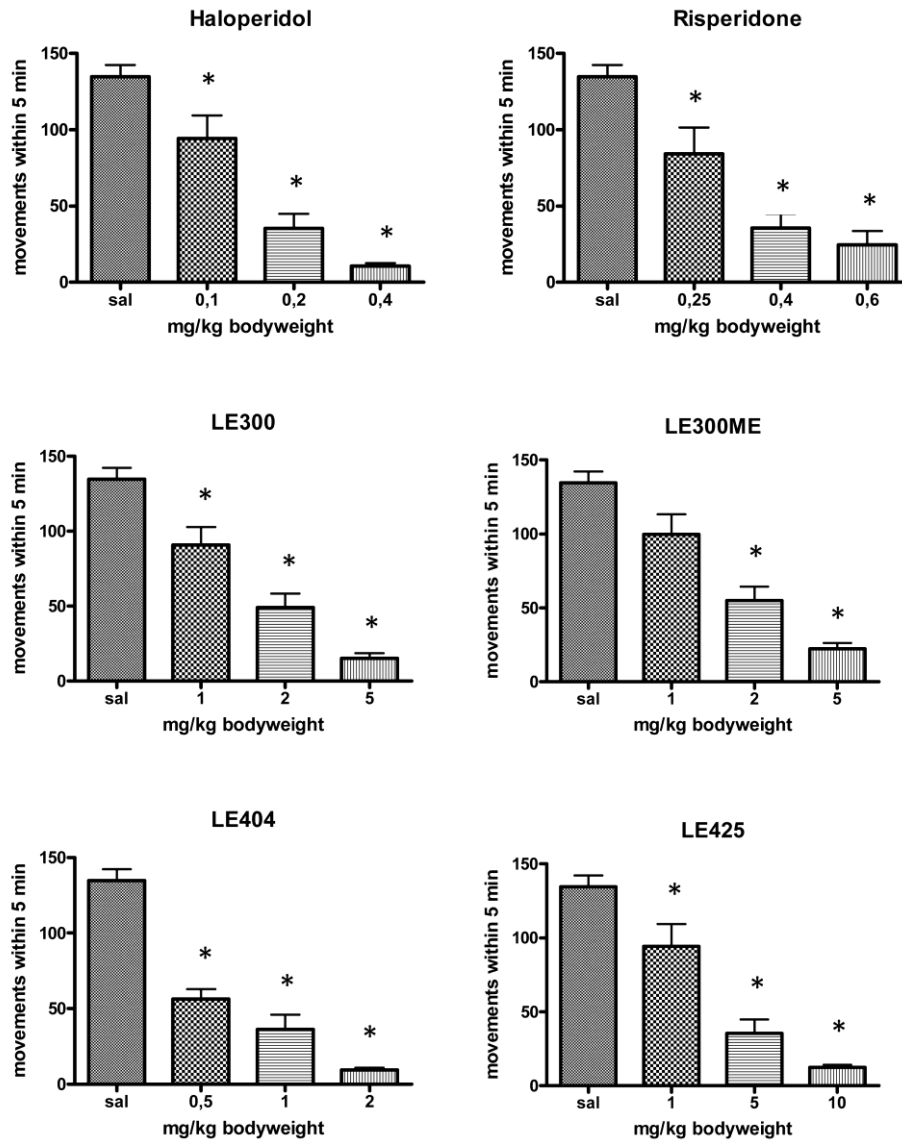


Figure 2: Summation of rearing and horizontal movement, measured by the amount of line crossing, 30min after administration of either saline solution, haloperidol, risperidone or one of the test compounds. Mean \pm SEM.; n = 8. * - significant differences to saline ($p \leq 0.05$)



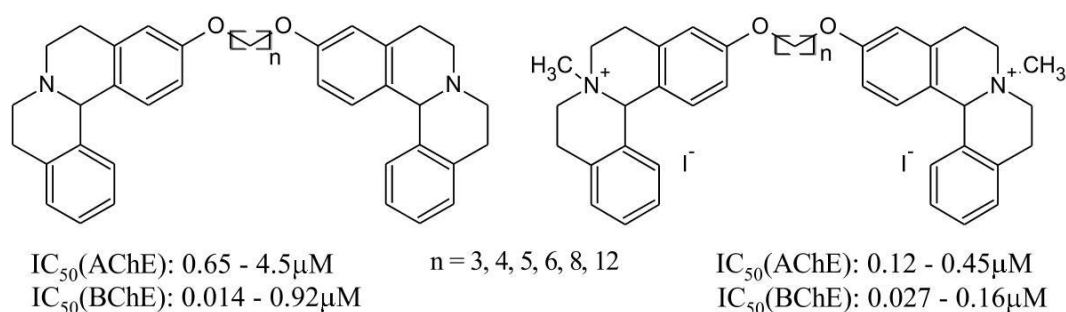
Publikation 4

Bivalent 5,8,9,13b-Tetrahydro-6*H*-isoquino[1,2-*a*]isoquinolines and –isoquinolinium Salts: Novel Heterocyclic Templates for Butyrylcholinesterase Inhibitors

Maria Schulze, Oliver Siol, Michael Decker und Jochen Lehmann

Bioorg Med Chem Lett **2010**, 20(9): 2.946-2.949.

Diese Publikation befasst sich mit bivalenten Dibenzo-Chinolizinen, -Chinoliziniumsalzen und -Azecinen als Cholinesterase-Inhibitoren. Es werden hierbei 14 neue Verbindungen hinsichtlich der Synthese und inhibitorischen Aktivität an Acetyl- (AChE) und Butyrylcholinesterase (BChE) vorgestellt, sowie Struktur-Wirkungs-Beziehungen diskutiert. Insgesamt wiesen die bivalenten Verbindungen eine deutlich höhere inhibitorische Aktivität, aber auch eine höhere Zytotoxizität im Vergleich zu den monovalenten Derivaten auf. Beide Wirkungen waren stark von der Kettenlänge des Spacers abhängig. Die meisten der bivalenten Verbindungen hemmten die Cholinesterasen in nanomolaren Konzentrationen. Insbesondere an der BChE zeigten die ungeladenen Derivate eine deutlich höhere kettenlängenabhängige Affinität und Selektivität als die geladenen Verbindungen. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit eine ungeladene Substanz identifiziert werden, die sowohl hohe Affinitäten an beiden Enzymen, als auch eine relativ geringe Zytotoxizität aufweist und somit für *in vivo*-Versuche in Frage kommt.



Graphical Abstract

Eigenanteil: Synthese aller Zielverbindungen. Durchführung des Hauptteils der pharmakologischen Testung an Cholinesterasen. Aufstellung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen. Erstellung des Manuskripts.



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl

Bivalent 5,8,9,13b-tetrahydro-6H-isoquino[1,2-a]isoquinolines and -isoquinolinium salts: Novel heterocyclic templates for butyrylcholinesterase inhibitors

Maria Schulze^a, Oliver Siol^b, Michael Decker^a, Jochen Lehmann^{a,*}^a Lehrstuhl für Pharmazeutische/Medizinische Chemie, Institut für Pharmazie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Philosophenweg 14, D-07743 Jena, Germany^b Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Institut für Pharmazie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Semmelweisstrasse 10, D-07743 Jena, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 February 2010

Revised 2 March 2010

Accepted 2 March 2010

Available online 6 March 2010

Keywords:

Bivalent inhibitor

Acetylcholinesterase

Butyrylcholinesterase

Cytotoxicity

ABSTRACT

Three different types of homobivalent compounds, 5,8,9,13b-tetrahydro-6H-isoquino[1,2-a]isoquinolines bearing tertiary N-atoms, their quaternary ammonium salts and their dibenzazecine analogues, connected by alkylene spacers of various lengths were synthesized. Compared to the therapeutically used inhibitor galanthamine, some of the bivalent compounds showed much higher inhibitory activities at both cholinesterases in the Ellman test. Surprisingly, not only the quaternary salts, but also the uncharged tertiary compounds exhibited IC₅₀ values at butyrylcholinesterase in the nanomolar range. Selectivity toward BChE of up to 76-fold was observed.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Cholinesterase (ChE) is one major target in the current therapy of Alzheimer's disease (AD). Clinically approved inhibitors of acetylcholinesterase (AChE) like rivastigmine, galanthamine and donepezil are the most commonly applied drugs for symptomatic treatment of cognitive deficits in AD. For the effectiveness of therapeutic intervention by ChE inhibition, the importance of a second, less specific cholinesterase in the human body, butyrylcholinesterase (BChE), is under current focus. While the treatment with selective AChE inhibitors is effective in the beginning of AD, their effectiveness decreases with progression of the disease which may be due in part to lower AChE-(10–15% of normal during AD progression), but elevated BChE-levels.¹ Positive effects of the administration of the selective BChE inhibitor cymserine on learning and β -amyloid peptide formation could be shown in rodents.²

Compound **1** (3-methoxy-5,8,9,13b-tetrahydro-6H-isoquino[1,2-a]isoquinoline) was originally synthesized as a precursor for highly potent dopamine antagonists.³

Some structural similarities of compound **1** to galanthamine can be found (Fig. 1). We therefore considered it to be of interest, if these structures might exhibit ChE-inhibiting properties, since there are considerable efforts made to find novel structural templates for ChE inhibitors with improved therapeutic profiles.⁴

In this regard, additionally bivalent compounds should be synthesized and evaluated pharmacologically. In the last decade, the bivalent ligand/inhibitor approach by combining covalently two identical (homobivalent) or chemically related (heterobivalent) drug molecules was successfully applied in various areas of therapeutic research (including AChE and BChE inhibitors) to yield highly potent compounds with sometimes remarkably increased selectivity profiles.^{5–7} Bivalent compounds of galanthamine were investigated by Guillou et al. and revealed inhibitory potencies of the homobivalent galanthamine derivatives equal to that of the univalent compound galanthamine at AChE and improved inhibition by heterodimers with galanthaminium substructure.⁸ The improved enzyme inhibition of the quaternary salt is not surprising, since the natural substrate acetylcholine (ACh) itself is a quaternary ammonium salt. Hence, we used compound **2** as a potential univalent inhibitor to design homobivalent molecules with alkylene chains of various lengths as spacer. A potential problem of these compounds lies in the fact that it is unlikely for charged molecules to pass the blood–brain barrier which represents a basic requirement for drugs against neurodegenerative disorders. Since a competitive and reversible ChE inhibitor interaction with the catalytic active site (CAS) is often mediated by a protonated tertiary N-atom, we also tested the uncharged compounds for their inhibitory potency. Univalent structures are shown in Figure 1.

The univalent precursor **4** was synthesized according to the synthetic scheme described by Mohr et al.,³ using (3-methoxyphenyl)ethylamine and isochroman-1-one as starting materials

* Corresponding author. Tel.: +49 3641 94 9800; fax: +49 3641 94 9802.

E-mail addresses: m.decker@qub.ac.uk (M. Decker), j.lehmann@uni-jena.de (J. Lehmann).

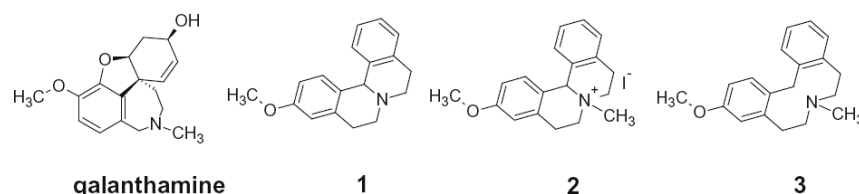


Figure 1. Tetracyclic compounds **1** and **2**, tricyclic compound **3** and the AChE inhibitor galanthamine.

(Scheme 1). Synthesis of homobivalent compounds **5a–f** with tertiary N-atoms was achieved in a Williamson ether synthesis by deprotonation of phenolic hydroxy groups using sodium hydride in DMF, followed by alkylation using half the molar amount of the respective dibromoalkane. Quaternization was performed with methyl iodide in acetonitrile/methanol. Compounds **7b** and **7e** were obtained under Birch conditions using sodium in liquid ammonia. Univalent structures were synthesized in the same manner.

We examined bivalent quaternary compounds **6a–f**, their non-charged precursors **5a–f**, the bivalent dibenzoazecines **7b,e** and the univalent congeners **1**, **2**, and **3** in the colorimetric Ellman assay at AChE (E.C. 3.1.1.7, type VI-S, from Electric Eel) and BChE (E.C. 3.1.1.8, from equine serum). Although there are a number of species-dependent differences between these enzymes and the human ones, the enzymes used show sufficient homology in the amino acid sequence to the human enzymes (e.g., 88% for equine serum BChE).⁹

Results of the cholinesterase assay are given in Table 1.

All compounds revealed higher inhibitory activities at both cholinesterases than the univalent congeners. As expected due to the similarity with the natural ligand ACh, the quaternary ammonium salts **6a–f** showed better potency for AChE inhibition than the uncharged molecules **5a–f**.

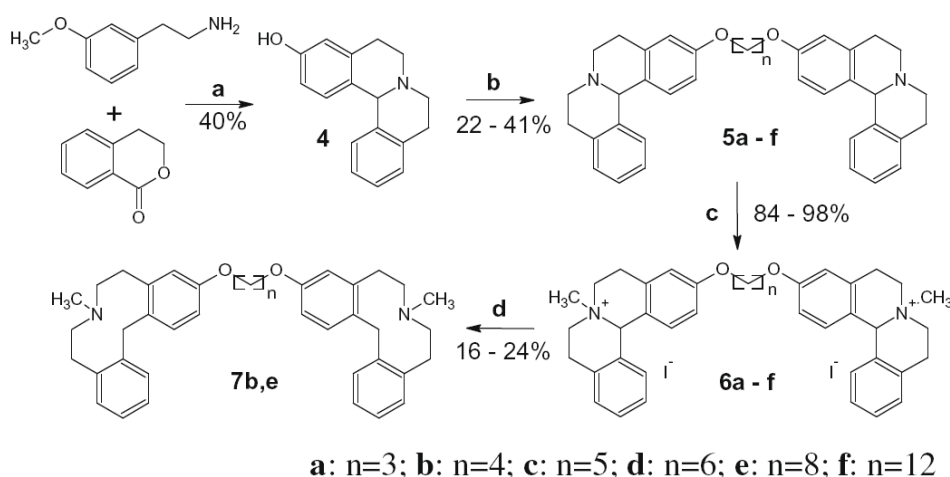
The univalent tertiary compounds 3-methoxy-5,8,9,13b-tetrahydro-6H-isoquino[1,2-a]isoquinoline (**1**) and 3-methoxy-7-methyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo[d,g]azecine (**3**) did not show activities at any ChE. The quaternary compound **2** is a micromolar non-selective inhibitor of both ChEs ($IC_{50}(\text{AChE}) = 8.8 \mu\text{M}$; $IC_{50}(\text{BChE}) = 6.4 \mu\text{M}$). Interestingly, the bivalent compounds showed much higher activities at both AChE and BChE. Regarding the bivalent 7-methyl-5,8,9,13b-tetrahydro-6H-isoquino[1,2-a]isoquin-

Table 1
Inhibitory activities at AChE- and BChE and resulting selectivities toward BChE

Compound	$IC_{50}(\text{AChE})^a$ (μM) ($pIC_{50} \pm \text{SEM}$)	$IC_{50}(\text{BChE})^a$ (μM) ($pIC_{50} \pm \text{SEM}$)	$IC_{50}(\text{AChE})/IC_{50}(\text{BChE})$
Galanthamine	0.64 (6.197 ± 0.052)	8.40 (5.076 ± 0.034)	0.08
1	>10,000	>10,000	—
2	8.8 (5.057 ± 0.055)	6.4 (5.197 ± 0.020)	1.4
3	>10,000	>10,000	—
5a	4.5 (5.347 ± 0.044)	0.15 (6.835 ± 0.051)	30.8
5b	1.1 (5.971 ± 0.076)	0.017 (7.768 ± 0.048)	76.2
5c	0.65 (6.511 ± 0.178)	0.017 (7.773 ± 0.036)	38.3
5d	0.69 (6.164 ± 0.158)	0.014 (7.846 ± 0.006)	48.9
5e	1.2 (5.920 ± 0.071)	0.68 (6.168 ± 0.047)	3.0
5f	4.1 (5.385 ± 0.051)	0.92 (6.035 ± 0.034)	4.2
6a	0.45 (6.343 ± 0.121)	0.16 (6.806 ± 0.033)	5.8
6b	0.39 (6.406 ± 0.076)	0.051 (7.293 ± 0.037)	8.8
6c	0.28 (6.546 ± 0.036)	0.047 (7.326 ± 0.055)	5.9
6d	0.15 (6.822 ± 0.020)	0.027 (7.570 ± 0.087)	5.6
6e	0.28 (6.557 ± 0.137)	0.11 (6.954 ± 0.034)	2.5
6f	0.12 (6.918 ± 0.055)	0.036 (7.452 ± 0.035)	3.4
7b	4.8 (5.317 ± 0.142)	0.14 (6.847 ± 0.022)	34.0
7e	2.0 (5.690 ± 0.106)	0.21 (6.683 ± 0.036)	9.9

^a IC_{50} values are means of at least three experiments.

olinium salts **6a–f**, all of these compounds are submicromolar inhibitors with inhibitory potencies from $IC_{50}(\text{AChE}) = 0.45 \mu\text{M}$ (compound **6a** with $n = 3$) to $IC_{50}(\text{AChE}) = 0.12 \mu\text{M}$ (compound **6f** with $n = 12$). Despite the considerable differences in the lengths of the alkylene spacers (from $n = 3$ to $n = 12$), the differences in potencies are minor, not exceeding a factor of four. For each compound, activities at BChE are even higher, ranging from $IC_{50}(\text{BChE}) = 0.16 \mu\text{M}$ (compound **6a** with $n = 3$) to $IC_{50}(\text{BChE}) = 0.027 \mu\text{M}$ (compound **6d** with $n = 6$).



Scheme 1. Synthesis of the test compounds. Reagents and conditions: (a) (i) 70 °C, 7d; (ii) POCl_3 , MeCN, 95 °C, 18 h; (iii) $\text{NaBH}_4/\text{MeOH}$, 0 °C to rt, 1 h; (iv) HBr, glacial acid, reflux, 5 h; (b) (i) NaH, dry DMF, 0 °C to rt, 1 h; (ii) dibromoalkane, dry DMF, rt, 24 h; (c) methyl iodide, MeCN/MeOH, rt, 6 h; (d) Na, NH_3 liq., –40 °C.

Despite the fact that the univalent tertiary compound **1** did not show significant activities at either AChE or BChE, the respective bivalent compounds **5a–f** turned out to be potent inhibitors, especially at BChE. Activities at AChE generally lay in the micro- and submicromolar range, with the lowest activity $IC_{50}(AChE) = 4.5 \mu M$ (compound **5a** with $n = 3$) and the most potent compound with an $IC_{50}(AChE) = 0.65 \mu M$ (compound **5c** with $n = 5$). In the contrary to the quaternary compounds **6a–f**, the tertiary compounds **5a–f** showed a tether length dependent potency with pentylene and hexylene chains as optimal spacers. This is in line with several examples from the literature, which identified these spacer lengths also as most favorable.^{5,10} Most interestingly, activities at BChE are much higher ranging from $IC_{50}(BChE) = 0.92 \mu M$ (compound **5f** with $n = 12$) down to $IC_{50}(BChE) = 0.014 \mu M$ (compound **5d** with $n = 6$). At BChE a dependency of the activity on spacer length could be observed: Only compounds with $n = 4, 5$, and 6 , respectively, showed activities from $IC_{50}(BChE) = 0.014–0.017 \mu M$, whereas $n = 3$ and also higher spacer lengths yielded compounds with 10 to 60-fold lower activities. Since the tertiary compounds **5a–f** exhibited lower activities at AChE and higher ones at BChE compared to quaternary compounds **6a–f**, BChE selectivity increased. The most selective compound **5b** ($n = 4$) showed a 76-fold selectivity towards BChE. Compounds **7b, e**, also with tertiary nitrogen atoms, but much less rigidized than compounds **5a–f**, exhibited lower activities than the other bivalent structures with the same spacer length. In general, most bivalent compounds synthesized showed similar or higher activities at AChE than the reference galanthamine, and all novel compounds were superior at BChE.

Interestingly, a relationship between spacer length and biological activity could be observed also in a cytotoxicity test on human glia cells (MG-U87) and neuronal cells (SH-SY5Y), which was performed prior to potential in vivo studies for compounds **5a–f** (Table 2). Therein cell viability was measured after substance administration according to previous described protocols¹¹ to assure innocuousness at effective concentrations in the brain. All CC_{50} values (EC_{50} equivalent of cytotoxicity tests) are at micromolar concentrations, with best ChE potency/toxicity ratio for compound **5d**. The univalent compound **1** showed much less effects on cell viability than the bivalent compounds.

There was a statistically significant relationship between spacer length and biological activity with the pentylene compound **5c** being the most cytotoxic one. In general though, much higher concentrations were necessary to observe cytotoxic effects than for AChE and particularly BChE-inhibition.

An increased activity at AChE of bivalent inhibitors could be explained by interaction of one part of the bivalent compound with the catalytic active site (CAS), where ACh is hydrolyzed, and the other part with the peripheral anionic binding site (PAS) at the outer site of the gorge.^{5,12} Due to the fact that quaternary compounds **6a–f** and the tertiary ones **5a–f** do not show highly significant correlation of inhibitory potency to spacer length at AChE, these interactions with the PAS do not seem to be pronounced and highly specific with tetrahydro-6H-isoquinol[1,2-a]isoquinolines and -iso-

quinolinium salts. Therefore docking results might be of limited value. The increase of BChE-activity is not straightforwardly explained, either. Only a very few sets of compounds have been described in which bivalency has led to pronounced increases in BChE selectivity without modifying the spacer.⁶ In the huge majority of cases an increased AChE selectivity resulted from bivalency.⁵ A related increase at BChE-activity and concomitant selectivity was observed with hybrid molecules from ChE-inhibiting quinazolinimines and lipoic acid.¹³ With these compounds kinetic measurements were not able to prove an interaction with a second distinct binding site additional to the CAS which would result in non-competitive reversible interaction. Compound **5d** was selected for kinetic measurements at BChE, as it showed highest potencies of all investigated compounds at BChE, high BChE selectivity, and low cytotoxicity, while representing an uncharged molecule for better passage of the blood–brain barrier. The mechanism of inhibition was investigated by recording substrate–velocity curves using various substrate concentrations at different concentrations of **5d**. The resulting Lineweaver–Burk plot (i.e., reciprocal velocities vs reciprocal substrate concentrations) is shown in Figure 2:

K_m values (i.e., the negative reciprocal of the X intercept) differ, but V_{max} values (i.e., the reciprocal of the Y intercept) do not significantly change with different inhibitor concentrations at BChE. This indicates a reversible and competitive inhibition with the substrate molecule, which means that the high inhibitory activity cannot be explained by interaction of compound **5b** with a second binding site, which would lead to an altered kinetic profile.

In conclusion, we have synthesized two new kinds of bivalent compounds, each with different spacer lengths ($n = 3$ up to $n = 12$). Tertiary and quaternary bivalent structures showed greatly enhanced inhibitory potencies compared to their univalent congeners at both AChE and BChE. The charged quaternary ammonium salts **6a–f** revealed better inhibitory activities (two-digit nanomolar IC_{50} values) at AChE and BChE than galanthamine, with moderate selectivity towards BChE. To potentially gain a better penetration of the blood–brain barrier we investigated also their non-charged but protonable precursors **5a–f**. Compounds **5c** and **5d** showed inhibitory activities at AChE comparable to galanthamine and BChE-inhibition in the low nanomolar range. For compounds **5a–d** a 30-fold up to 76-fold selectivity towards BChE could be observed, what might be advantageous for the treatment in the progressed forms of Alzheimer's disease.^{2,14} Inhibitory activities at cholinesterases, especially BChE, and cytotoxic effects were spacer length dependent for these substances. The bivalent ligand approach on 5,8,9,13b-tetrahydro-6H-isoquinol[1,2-a]isoquinolines and -isoquinolinium salts led to compounds with greatly enhanced, submicromolar activities at both ChEs and selectivity towards BChE, introducing a novel structural template for BChE inhibitors.

Table 2
Cell viability measured in a photometric MTT assay

Compound	CC_{50} (μM) glia cells	CC_{50} (μM) neuronal cells
1	774.9 \pm 22.1	171.1 \pm 41.70
5a	26.92 \pm 1.93	8.94 \pm 1.93
5b	19.51 \pm 3.00	6.35 \pm 1.30
5c	8.70 \pm 2.94	—
5d	20.73 \pm 1.13	7.40 \pm 0.22
5e	41.97 \pm 6.86	19.24 \pm 1.85
5f	46.63 \pm 7.98	—

CC_{50} values are means of at least three experiments, each performed in triplicate \pm SD.

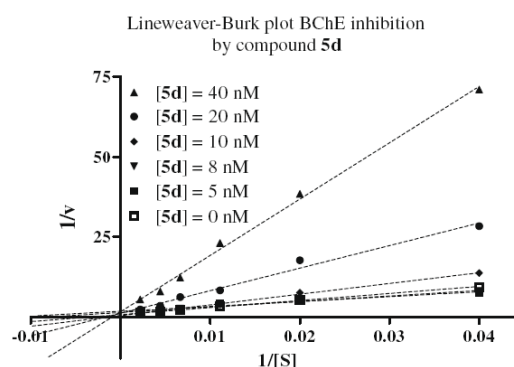


Figure 2. Lineweaver–Burk plot resulting from substrate–velocity curves at different concentrations of compound **5d**.

Acknowledgment

The authors would like to thank Petra Wiecha for the reliable technical assistance in performing the cholinesterase assay.

Supplementary data

Supplementary data (syntheses and spectral data of target compounds, substrate–velocity curves and description of pharmacological assays) associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bmcl.2010.03.011.

References and notes

1. Giacobini, E.; DeSarno, P.; Clark, B.; McIlhenny, M. *Prog. Brain Res.* **1989**, *79*, 335.
2. Greig, N. H.; Utsuki, T.; Ingram, D. K.; Wang, Y.; Pepeu, G.; Scali, C.; Yu, Q. S.; Mamczarz, J.; Holloway, H. W.; Giordano, T.; Chen, D.; Furukawa, K.; Sambamurti, K.; Brossi, A.; Lahiri, D. K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 17213.
3. Mohr, P.; Decker, M.; Enzensperger, C.; Lehmann, J. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2110.
4. Loizzo, M. R.; Tundis, R.; Menichini, F.; Menichini, F. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 1209.
5. Du, D. M.; Carlier, P. R. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 3141.
6. Decker, M. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5411.
7. Peng, X.; Neumeyer, J. L. *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*, 363.
8. Guillou, C.; Mary, A.; Renko, D. Z.; Gras, E.; Thal, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 637.
9. Savini, L.; Gaeta, G.; Fattorusso, C.; Catalanotti, B.; Campiani, G.; Chiasserini, L.; Pellerano, C.; Novellino, E.; McKissic, D.; Saxena, A. S. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1.
10. Holzgrabe, U.; Kapkova, P.; Alptuzun, V.; Scheiber, J.; Kugelmann, E. *Expert Opin. Ther. Targets* **2007**, *11*, 161.
11. Schulze, M.; Siol, O.; Meise, W.; Lehmann, J.; Enzensperger, C. *Arch. Pharm.* **2010**, accepted.
12. Pang, Y. P.; Quiram, P.; Jelacic, T.; Hong, F.; Brimijoin, S. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 23646.
13. Decker, M.; Kraus, B.; Heilmann, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 4252.
14. O'Brien, K. K.; Saxby, B. K.; Ballard, C. G.; Grace, J.; Harrington, F.; Ford, G. A.; O'Brien, J. T.; Swan, A. G.; Fairbairn, A. F.; Wesnes, K.; del Ser, T.; Edwardson, J. A.; Morris, C. M.; McKeith, I. G. *Pharmacogenetics* **2003**, *13*, 231.

Supporting Information

The supporting Information contains detailed experimental procedures concerning pharmacological assays (Ellman assay and MTT test), syntheses and analytical data (NMR, HRMS, elemental analyses) of the compounds.

Experimental Procedures for Syntheses:

General methods: Melting points are uncorrected and were measured in open capillary tubes, using a Gallenkamp melting point apparatus. ^1H (and ^{13}C NMR) data were measured on a Bruker Advance 250 spectrometer at 250 MHz (70 MHz, respectively). Elemental analyses were performed on a Hereus Vario EL apparatus and HRMS were recorded by a TSQ Quantum AM spectrometer by ThermoElectron.

General procedures

Synthesis of bivalent compounds **5a-f**: 5,8,9,13b-tetrahydro-6H-isoquino[1,2-a]isoquinolin-3-ol¹ (251mg; 1 mmol) was dissolved in 20 mL of dry DMF. The solution was cooled in an ice bath to 0°C before sodium hydride (29mg, 1.2 mmol) was added in small portions. The mixture was stirred at room temperature under nitrogen for one hour. The appropriate dibromoalkane (0.6 mmol), dissolved in 1mL of dry DMF, was added drop wise. Stirring under nitrogen at room temperature for 24 hours led to the formation of a yellow suspension. After removing the solvent *in vacuo*, the residue was dissolved in 50mL of dichlormethane and washed twice with sodium hydroxide solution (2 M). The organic layer was dried over sodium sulphate and the solvent removed *in vacuo*.

The resulting brown crude products were recrystallized from methanol to yield compounds **5a-f**. HCl salts were obtained by adding a few drops of etheric HCl to a solution of **5a-f** in diethylether. The precipitate was filtered off and dried *in vacuo*.

Methylation of compounds **5b-f** to obtain compounds **6b-f**: The bivalent compounds **5b-f** (0.1mmol) were dissolved in 8 mL of a mixture of acetonitrile and methanol (1/1). After addition of a 10fold excess of iodomethane the solutions were stirred at room temperature under nitrogen for 6 hours. Approximately half the solvent was removed *in vacuo* before 10mL of diethylether were added.

The resulting yellow precipitates were filtered off, washed with little acetonitrile and dried *in vacuo* to yield compounds **6b-f**.

Compound **6a** was synthesized in a different manner, because the standard route for compound **5a** was not successful in yields sufficient for a subsequent reaction step. Starting material was compound **2**, synthesized according to literature procedure¹ by methylation of 3-methoxy-5,8,9,13b-tetrahydro-6H-isoquino[1,2-a]isoquinoline (**1**) with an excess of iodomethane in acetonitril. Compound **2** (0.22 g, 0.6 mmol), potassium carbonate (0.3 g, 3.0 mmol) and 0.4 g of molecular sieve (dried at 600°C for 4 hours prior to the experiment) were suspended in dry DMF (15 mL) and stirred at 60°C under nitrogen for one hour. 1,4-Dibromopropane (0.064 g) were dissolved in dry THF and added drop wise to the stirred mixture. After stirring for 4 hours at room temperature the molecular sieve was filtered off and the solvent removed *in vacuo*.

The resulting brown oil was purified by column chromatography using a neutral aluminum oxide column and chloroform/methanol (8/1) as eluent. Fractions containing the product were merged and the solvent removed *in vacuo*. The resulting oil was dissolved in a small amount of isopropanol and crystallized after addition of diethylether.

Synthesis of bivalent compounds **7b** and **7e**: A 100 mL three-neck flask equipped with a balloon as an overflow tank was cooled in a liquid nitrogen bath. Ammonia was condensed into this flask until it was $\frac{3}{4}$ filled. The cooling bath was removed and the ammonia was allowed to liquefy. After suspending 0.6 mmol of the quaternary salts (**6a-f**) in liquid ammonia, rice-grain-sized pieces of sodium were added to the stirred mixture until the blue color remained for 10 min. The mixture was quenched with 1-2 drops of saturated aqueous NH_4Cl and the ammonia was evaporated under nitrogen. The residue was portioned between ether and water and was stirred until two phases separated. The aqueous phase was extracted with ether (3 x 15 mL) and the combined organic phases were dried over MgSO_4 . The solvent was evaporated *in vacuo* to yield the ring open compounds **7b, e**.

The crude products were washed twice with methanol. The residue was dissolved in a small amount 2-propanol. After addition of two drops of etheric HCl and diethylether, the HCl-salts precipitated as white powders. The products were filtered off, recrystallized from methanol/diethylether and dried *in vacuo*.

3-[3-(5,8,9,13b-tetrahydro-6H-isoquino[1,2-a]isoquinolin-3-yloxy)propoxy]-5,8,9,13b-tetrahydro-6H-isoquino[1,2-a]isoquinoline (5a): orange powder, Mp.: 139°C , yield 21%. $^1\text{H-NMR}$: 250 MHz (CDCl_3): δ 2.21 – 2.26 (m, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{R}$); 2.88 – 2.94 (m, 8H, C5, C9); 3.09 – 3.18 (m, 8H, C6, C8); 4.11 – 4.16 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H, $\text{O-CH}_2\text{R}$); 5.05 (s, 2H, C13b); 6.70 (s, 2H, C4); 6.73 – 6.74 (d, $J = 2.5$ Hz, 2H, C2); 7.15 – 7.22 (m, 10H, C1, C10-C13). $^{13}\text{C-NMR}$: 250 MHz (CDCl_3): δ 26.43; 26.71; 29.39; 47.16; 47.20; 59.87; 64.39; 111.98; 114.58; 125.31; 126.59; 128.50; 128.75; 129.19; 129.80; 134.14; 135.48; 136.39; 157.48. Anal. calcd. for $\text{C}_{37}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_2 \times \text{MeOH}$: C 79.41%, H 7.37%, N 4.87%, found C 79.20%, H 6.99%, N 4.70%.

3-[4-(5,8,9,13b-tetrahydro-6H-isoquino[1,2-a]isoquinolin-3-yloxy)butoxy]-5,8,9,13b-tetrahydro-6H-isoquino[1,2-a]isoquinoline (5b): yellow powder, Mp.: 129°C , yield 36%. $^1\text{H-NMR}$: 250 MHz (CDCl_3): δ 1.91 – 1.97 (m, 4H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{R}$); 2.89 – 2.94 (m, 8H, C5, C9); 3.14 – 3.18 (m, 8H, C6, C8); 3.95 – 4.08 (m, 4H, $\text{O-CH}_2\text{R}$); 5.05 (s, 2H, C13b); 6.64 – 6.71 (m, 4H, C2, C4); 7.08 – 7.26 (m, 10H, C1, C10-C13). $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT: 250 MHz (CDCl_3): δ 26.03; 26.50; 26.75; 47.19; 47.29; 59.90 (R_3CH , 13b); 67.38; 111.92; 114.61; 125.28; 126.56; 128.47 (quat.); 128.75; 129.19; 129.77 (quat.); 134.21 (quat.); 135.51; 136.49(quat.); 157.58 (quat.). HRMS m/z calcd. for $\text{C}_{38}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_2$ 557.3163 found 557.3167.

3-[[5-(5,8,9,13b-tetrahydro-6H-isoquino[1,2-a]isoquinolin-3-yloxy)pentyl]oxy]-5,8,9,13b-tetrahydro-6H-isoquino[1,2-a]isoquinoline (5c): yellow powder, Mp.: 97°C , yield 26%. $^1\text{H-NMR}$: 250 MHz (CDCl_3): δ 1.64 – 1.70 (m, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{R}$); 1.80 – 1.88 (m, 4H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{R}$); 2.81 – 2.98 (m, 8H, C5, C9); 3.07 – 3.27 (m, 8H, C6, C8); 3.94 – 3.99 (t, $J = 6.3$ Hz, 4H, $\text{O-CH}_2\text{R}$); 5.06 (s, 2H, C13b); 6.69 – 6.73 (m, 4H, C2, C4); 7.09 – 7.22 (m, 10H, C1, C10-C13). $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT: 250 MHz (CDCl_3): δ 22.75; 26.54; 26.78; 29.07; 47.21; 47.34; 59.93 (R_3CH , 13b); 67.68; 111.90; 114.62; 125.26; 126.53; 128.45 (quat.); 128.76; 129.18; 129.76 (quat.);

134.24 (quat.); 135.52; 136.55 (quat.); 157.63 (quat.). HRMS m/z calcd. for $C_{39}H_{43}N_2O_2$ 571.3319 found 571.3307. Anal. calcd. for $C_{39}H_{42}N_2O_2$: C 82.07%, H 7.42%, N 4.91%, found C 81.82%, H 7.23%, N 4.75%.

3-{{[6-(5,8,9,13b-tetrahydro-6H-isoquino[1,2-a]isoquinolin-3-yloxy)hexyl]oxy}-5,8,9,13b-tetrahydro-6H-isoquino[1,2-a]isoquinoline (5d): yellow powder, Mp.: 76°C, yield: 41%. 1H -NMR 250 MHz ($CDCl_3$): δ 1.49 – 1.61 (m, 4H, O-CH₂-CH₂-CH₂R); 1.71 – 1.88 (m, 4H, O-CH₂-CH₂R); 2.81 – 2.94 (m, 8H, C5, C9); 3.09 – 3.24 (m, 8H, C6, C8); 3.92 – 3.97 (t, J = 6.4 Hz, 4H, O-CH₂R); 5.06 (s, 2H, C13b); 6.68 – 6.71 (m, 4H, C2, C4); 7.08 – 7.18 (m, 10H, C1, C10-C13). ^{13}C -NMR, DEPT: 250 MHz ($CDCl_3$): δ 25.88; 26.54; 26.77; 29.25; 47.20; 47.34; 59.92 (R_3CH , 13b); 67.74; 111.89; 114.62; 125.25; 126.52; 128.40 (quat.); 128.77; 129.18; 129.75 (quat.); 134.23 (quat.); 135.50; 136.54 (quat.); 157.67 (quat.). HRMS m/z calcd. for $C_{40}H_{45}N_2O_2$ 585.3476 found 585.3473. Anal. calcd for $C_{40}H_{44}N_2O_2 \times \frac{1}{2} MeOH$: C 80.96%, H 7.72%, N 4.66%, found C 80.90%, H 7.67%, N 4.74%.

3-{{[8-(5,8,9,13b-tetrahydro-6H-isoquino[1,2-a]isoquinolin-3-yloxy)octyl]oxy}-5,8,9,13b-tetrahydro-6H-isoquino[1,2-a]isoquinoline (5e): Attempts to recrystallize from methanol revealed a bright yellow precipitate which was filterered off. Drying in vacuo at 40°C led to a viscous non-crystallizing orange oil, yield 39%. 1H -NMR: 250 MHz ($DMSO-d_6$): δ 1.41 – 1.51 (m, 8H, O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂R); 1.71 – 1.81 (m, 4H, O-CH₂-CH₂R); 2.83 – 2.94 (m, 8H, C5, C9); 3.09 – 3.96 (m, 8H, C6, C8); 3.91-3.96 (t, J = 6.5 Hz, 4H, O-CH₂R); 5.05 (s, 2H, C13b); 6.68 – 6.73 (m, 4H, C2, C4); 7.08 – 7.19 (m, 10H, C1, C10-C13). ^{13}C -NMR, DEPT: 250 MHz ($DMSO-d_6$): δ 26.00; 26.52; 26.76; 29.29; 47.18; 47.32; 59.91 (R_3CH , 13b); 67.86; 111.90; 114.60; 125.27; 126.54; 128.32 (quat.); 128.78; 129.19; 129.75 (quat.); 134.21 (quat.); 135.46; 136.53 (quat.); 157.61 (quat.). Anal. calcd for $C_{42}H_{48}N_2O_2 \times \frac{1}{3} MeOH$: C 81.73%, H 7.96%, N 4.51%, found C 82.00%, H 7.69%, N 4.70%.

3-{{[12-(5,8,9,13b-tetrahydro-6H-isoquino[1,2-a]isoquinolin-3-yloxy)dodecyl]oxy}-5,8,9,13b-tetrahydro-6H-isoquino[1,2-a]isoquinoline (5f): Attempts to recrystallize from methanol yielded a bright yellow precipitate which was filterered off. Drying in vacuo at 40°C led to a viscous non-crystallizing orange oil, yield 32%. 1H -NMR: 250 MHz ($CDCl_3$): δ 1.30 – 1.44 (m, 16H, O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂R); 1.71 – 1.82 (quin, J = 6.4 Hz, 4H, O-CH₂-CH₂R); 2.89 – 2.96 (m, 8H, C5, C9); 3.07 – 3.24 (m, 8H, C6, C8); 3.90 – 3.95 (t, J = 6.6 Hz, 4H, O-CH₂R); 5.06 (s, 2H, C13b); 6.66 – 6.74 (m, 4H, C2, C4); 7.08 – 7.22 (m, 10H, C1, C10-C13). ^{13}C -NMR, DEPT: 250 MHz ($CDCl_3$): δ 26.06; 26.54; 26.77; 29.32; 29.40; 29.56; 47.19; 47.34; 59.92 (R_3CH , 13b); 67.91; 111.89; 114.60; 125.25; 126.53; 128.32 (quat.); 128.78; 129.19; 129.74 (quat.); 134.23 (quat.); 135.46; 136.56 (quat.); 157.67 (quat.). Anal. calcd. for $C_{46}H_{56}N_2O_2$: C 82.59%, H 8.44%, N 4.19%, found C 82.90%, H 8.44%, N 4.27%.

7-methyl-3-{{[3-[(7-methyl-5,8,9,13b-tetrahydro-6H-isoquino[1,2-a]isoquinolinium-3-yl)oxy]propoxy}-5,8,9,13b-tetrahydro-6H-isoquino[1,2-a]isoquinolinium dibromide (6a): Compound 6a was synthesized on another route than the quinoliniumsalts 6b-6f as described in the general procedures. Pale yellow powder, Mp.: 56°C, yield 98%. 1H -NMR: 250 MHz (methanol- d_4): δ 2.19 – 2.29 (quin, J = 6.1, 2H, O-CH₂-CH₂R); 3.25 (s, 6H, N-CH₃); 3.25 – 3.30 (m, 8H, C5, C9); 3.82 – 3.85 (m, 8H, C6, C8); 4.17 – 4.21 (t, J = 6.1 Hz, 4H, O-CH₂R); 5.78 (s, 2H, C13b); 6.87-6.94 (m, 4H, C2, C4); 7.04 – 7.07 (d, J = 8.6, 2H, C1); 7.16 – 7.19 (d, J = 7.6, 2H, C13); 7.29 – 7.44 (m, 6H, C10-C12). ^{13}C -NMR, DEPT: 250 MHz (methanol- d_4): δ 21.93; 22.26; 27.31; 47.93 (N-CH₃); 54.76; 55.26; 62.82; 67.91 (R_3CH , 13b); 112.20; 112.60; 120.56 (quat); 125.44; 127.42; 127.48;

127.56; 128.33 (quat); 128.57 (quat); 128.73; 130.02 (quat), 158.04(quat). Anal. calcd. for $C_{39}H_{44}Br_2N_2O_2 \times \frac{1}{5}$ *i*-propanol: C 63.88%, H 6.17%, N 3.76%, found C 63.50%, H 6.05%, N 3.55%.

7-methyl-3-{4-[(7-methyl-5,8,9,13b-tetrahydro-6*H*-isoquino[1,2-*a*]isoquinolinium-3-yl)oxy]butoxy}-5,8,9,13b-tetrahydro-6*H*-isoquino[1,2-*a*]isoquinolinium diiodide (6b) yellow powder, Mp.: 102°C, yield: 91%; 1H -NMR: 250 MHz (DMSO- d_6): δ 1.81 – 1.89 (m, 4H, O-CH₂-CH₂R); 3.15 – 3.23 (m, 8H, C5, C9); 3.30 (s, 6H, N-CH₃); 3.71 – 3.81 (m, 8H, C6, C8); 4.01 – 4.09 (m, 4H, O-CH₂R); 5.85 (s, 2H, C13b); 6.89-6.92 (m, 4H, C2, C4); 7.01 – 7.04 (d, J = 8.4, 2H, C1); 7.11 – 7.14 (d, J = 7.4, 2H, C13); 7.32 – 7.39 (m, 6H, C10-C12). ^{13}C -NMR, DEPT: 250 MHz (DMSO- d_6): δ 23.62; 23.93; 25.80; 49.91 (N-CH₃); 55.90; 56.03; 67.75; 68.51 (R₃CH, 13b); 114.05; 114.76; 122.48; 127.30; 129.13 (quat); 129.26; 129.74; 130.45; 130.63 (quat); 130.70 (quat); 132.08 (quat), 159.05 (quat). Anal. calcd. for $C_{40}H_{46}I_2N_2O_2$: C 57.15%, H 5.52%, N 3.33%, found C 57.00%, H 5.42%, N 2.98%.

7-methyl-3-{5-[(7-methyl-5,8,9,13b-tetrahydro-6*H*-isoquino[1,2-*a*]isoquinolinium-3-yl)oxy]pentyl}oxy)-5,8,9,13b-tetrahydro-6*H*-isoquino[1,2-*a*]isoquinolinium diiodide (6c): yellow powder, Mp.: 141°C, yield: 96%; 1H -NMR: 250 MHz (methanol- d_4): δ 1.60 – 1.71 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-CH₂R); 1.80 – 1.88 (quin, J = 7.0Hz, 4H, O-CH₂-CH₂R) 3.19 – 3.35 (m, 14H, C5, C9, N-CH₃); 3.86 – 3.91 (m, 8H, C6, C8); 4.02 – 4.06 (t, J = 6.3, 4H, O-CH₂R); 5.85 (s, 2H, C13b); 6.86 – 6.92 (m, 4H, C2, C4); 7.04 – 7.07 (d, J = 8.2, 2H, C1); 7.17 – 7.21 (d, J = 7.7, 2H, C13); 7.31 – 7.45 (m, 6H, C10-C12). HRMS m/z calcd. for $C_{41}H_{48}N_2O_2$ 300.1852 found 300.1879.

7-methyl-3-{6-[(7-methyl-5,8,9,13b-tetrahydro-6*H*-isoquino[1,2-*a*]isoquinolinium-3-yl)oxy]hexyl}oxy)-5,8,9,13b-tetrahydro-6*H*-isoquino[1,2-*a*]isoquinolinium diiodide (6d): yellow powder, Mp.: 234°C, yield: 98%; 1H -NMR: 250 MHz (methanol- d_4): δ 1.45 – 1.49 (m, 4H, O-CH₂-CH₂-CH₂R); 1.73 – 1.76 (m, 4H, O-CH₂-CH₂R); 3.15 – 3.26 (m, 14H, C5, C9, N-CH₃); 3.76 – 3.89 (m, 8H, C6, C8); 4.39 – 4.42 (t, J = 6.4, 4H, O-CH₂R); 5.88 (s, 2H, C13b); 7.30 – 7.35 (m, 4H, C2, C4); 7.44 – 7.46 (d, J = 8.6, 2H, C1); 7.55 – 7.57 (d, J = 7.6, 2H, C13); 7.73 – 7.84 (m, 6H, C10-C12). ^{13}C -NMR, DEPT: 250 MHz (methanol- d_4): δ 24.09; 24.40; 26.18; 29.47; 50.39 (N-CH₃); 56.37; 56.57; 68.49; 68.99 (R₃CH, 13b); 114.49; 115.19; 122.86; 127.74; 129.57 (quat); 129.70; 130.16; 130.90; 131.04 (quat); 131.15 (quat); 132.52 (quat), 159.57 (quat). HRMS m/z calcd. for $C_{42}H_{50}N_2O_2$ 307.1931 found 307.1933.

7-methyl-3-{8-[(7-methyl-5,8,9,13b-tetrahydro-6*H*-isoquino[1,2-*a*]isoquinolinium-3-yl)oxy]octyl}oxy)-5,8,9,13b-tetrahydro-6*H*-isoquino[1,2-*a*]isoquinolinium diiodide (6e): yellow powder, Mp.: 233°C, yield: 91%; 1H -NMR: 250 MHz (DMSO- d_6): δ 1.33 – 1.43 (m, 8H, O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂R); 1.61 – 1.71 (m, 4H, O-CH₂-CH₂R); 3.15 – 3.26 (m, 14H, C5, C9, N-CH₃); 3.76 – 3.84 (m, 8H, C6, C8); 3.93 – 3.98 (t, J = 6.3, 4H, O-CH₂R); 5.86 (s, 2H, C13b); 6.86 – 6.91 (m, 4H, C2, C4); 7.00 – 7.03 (d, J = 8.6, 2H, C1); 7.11 – 7.14 (d, J = 7.3, 2H, C13); 7.28 – 7.42 (m, 6H, C10-C12). ^{13}C -NMR, DEPT: 250 MHz (DMSO- d_6): δ 23.61; 23.94; 25.92; 29.05; 29.16; 49.89 (N-CH₃); 55.88; 56.07; 68.06; 68.51 (R₃CH, 13b); 114.03; 114.70; 122.38 (quat); 127.31; 129.13; 129.27; 129.73; 130.43 (quat); 130.61; 130.70 (quat); 132.05 (quat), 159.12 (quat). HRMS m/z calcd. for $C_{44}H_{54}N_2O_2$ 321.2087 found 321.2075.

7-methyl-3-{12-[(7-methyl-5,8,9,13b-tetrahydro-6*H*-isoquino[1,2-*a*]isoquinolinium-3-yl)oxy]dodecyl}oxy)-5,8,9,13b-tetrahydro-6*H*-isoquino[1,2-*a*]isoquinolinium diiodide (6f): yellow powder, Mp.: 133°C, yield: 84%. 1H -NMR: 250 MHz (methanol- d_4): δ 1.15 – 1.46 (m, 16H, O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-

CH₂R); 1.73 – 1.79 (m, 4H, O-CH₂-CH₂R); 3.28 – 3.35 (m, 14H, C5, C8, N-CH₃); 3.76 – 3.84 (m, 8H, C6, C7); 3.96 – 4.01 (t, $J = 6.3$, 4H, O-CH₂R); 5.84 (s, 2H, C13b); 6.84 – 6.91 (m, 4H, C2, C4); 7.04 – 7.07 (d, $J = 8.6$, 2H, C1); 7.18 – 7.21 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, C13); 7.30 – 7.44 (m, 6H, C10-C12). ¹³C-NMR, DEPT: 250 MHz (methanol-*d*₄): δ 23.47; 23.81; 25.70; 28.86; 29.02; 29.21; 29.24; 49.48 (N-CH₃); 56.29; 56.82; 67.87; 69.43 (R₃CH, 13b); 113.66; 114.05; 121.71 (quat); 126.91; 128.92; 128.94; 129.05; 129.78; 130.08 (quat); 130.15 (quat); 131.38 (quat), 159.75 (quat). Anal. calcd. for C₄₈H₆₂I₂N₂O₂: C 60.51%, H 6.51%, N 2.91%, found C 60.81%, H 6.30%, N 3.01%.

7-methyl-3-{4-[(7-methyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo[*d,g*]azecin-3-yl)oxy]butoxy}-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo[*d,g*]azecine (7b): yellow foam, HCl salt white powder, Mp.: 237°C, yield: 16%. ¹H-NMR: 250 MHz (methanol-*d*₄): δ 1.82 – 1.90 (m, 4H, O-CH₂-CH₂R); 2.60 (s, 6H, N-CH₃); 2.98 – 3.04 (m, 8H, C6, C8); 3.17 – 3.25 (m, 8H, C5, C9); 3.92 – 3.98 (m, 4H, O-CH₂R); 4.14 (s, 4H, C14); 6.66 – 6.76 (m, 4H, C2, C4); 7.14 – 7.37 (m, 10H, C1, C10-C13). ¹³C-NMR: 250 MHz (methanol-*d*₄): δ 25.72; 29.91; 29.99; 35.28; 44.85; 58.00; 61.23; 67.24; 113.00 (C2); 115.74 (C4); 126.49; 130.11; 130.39; 131.34; 131.86; 134.59; 137.20; 138.57; 140.26; 157.85. HRMS *m/z* calcd. for C₄₀H₄₉N₂O₂: 589.3789 found 589.3759. Anal. calcd. for C₄₀H₄₈N₂O₂ x 2HCl x ¹/₃ H₂O: C 71.95%, H 7.65%, N 4.20%, found C 72.09%, H 7.32%, N 4.21%.

7-methyl-3-{4-[(7-methyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo[*d,g*]azecin-3-yl)oxy]octyl}-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo[*d,g*]azecine (7e): HCl salt white powder, Mp.: 139-144°C, yield: 24%. ¹H-NMR: 250 MHz (methanol-*d*₄): δ 1.30-1.47 (m, 8H, O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂R); 1.71 – 1.75 (m, 4H, O-CH₂-CH₂R); 2.90 (s, 6H, N-CH₃); 3.18 – 3.46 (m, 8H, C6, C8); 3.50 – 3.61 (m, 8H, 5, 9); 3.91 – 3.98 (m, 4H, O-CH₂R); 4.09 – 4.11 (d, $J = 9.6$ Hz, 4H, 14); 6.62 – 6.81 (m, 4H, 2, 4); 7.22 – 7.49 (m, 10H, 1, 10-13). ¹³C-NMR, DEPT: 250 MHz (methanol-*d*₄): δ 25.95; 26.19; 26.46; 29.09; 29.18; 36.56; 46.91; 46.99; 59.73 (N-CH₃); 67.86; 112.03 (C2); 114.50 (C4); 125.38; 126.70; 127.88 (quat.); 128.73; 129.15; 129.76; 133.83 (quat.); 135.11 (quat.); 136.04 (quat.); 157.74 (quat.). Anal. calcd. for C₄₄H₅₆N₂O₂ x 2HCl x ¹/₄ H₂O: C 73.16%, H 8.16%, N 3.88%, found C 72.99%, H 7.90%, N 4.11%.

Experimental Pharmacological Procedures:

MTT assay

U87-MG glia cells (HTB-14; ATCC, USA) and SH-SY5Y neuronal cells (CRL-2266; ATCC, USA) were cultured at 37 °C, and 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) (PAA, Austria) + 10% Fetal calf serum (FCS) (Thermo Scientific HyClone, UK). In 96-well plates 15,000 U87 cells (SH-SY5Y: 20,000) were dispersed in 200 μ L of medium into each well. After 24 hours the medium was replaced by DMEM + FCS containing the test compound dissolved in DMSO to yield a final concentration of 0.25%. To minimize edge-effects² only the inner 6x10 wells of the plate were analyzed and each concentration of each compound was measured in 6 wells distributed across the 96-well plate.² The outer wells were filled with 200 μ L of PBS-buffer, containing 8.0 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄ and 0.24 g KH₂PO₄ (all obtained from Roth, Germany) in 1 L H₂O. As positive control, 6 wells with cells and medium containing 0.25% DMSO were analyzed. The solubility of all compounds in all concentrations was observed by microscopy. Values of not completely dissolved compounds were discarded. After 24 hours of incubation, medium was removed and 100 μ L of 3-(4,5-

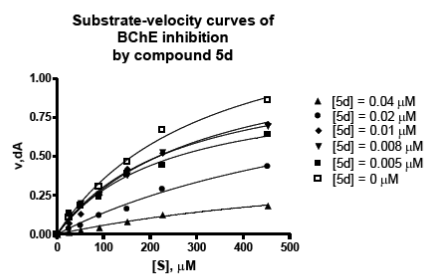
dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Fluka, Switzerland), dissolved in phenol red-free DMEM (without FCS) at 0.5 mg/mL were added to each well before the plates were incubated for 4 hours. By addition of 10% sodium dodecyl sulphate (SDS) (Roth, Germany) in H₂O, followed by incubation overnight at 37°C, cells were killed and formazan crystals were solubilised. Optical density was measured at 544 nm using a microplate reader (Galaxy FluoStar, BMG Labtechnologies Offenburg, Germany) and background subtraction (compounds in the same preparation without cells). Cell viability values were calculated as percentage of positive control (= 100%). The CC₅₀ values were calculated with *Graph Pad Prism*TM 4. All experiments were repeated at least three times independently.

Cholinesterase inhibition assay

AChE (E.C.3.1.1.7, Type VI-S, from Electric Eel) and BChE (E.C.3.1.1.8, from equine serum), 2,4-Dinitro-1-thiocyanobenzene (DTNB; Ellman's reagent), acetylthiocholinium- (ATC), butyrylthiocholinium (BTC) iodides and KH₂PO₄, all obtained from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany) were used to prepare the solutions as follows: DTNB solution (0.01M) contained 0.396g DTNB and 0.15g NaHCO₃ in 100 mL of H₂O. Enzyme solution (2.5 units/mL) was prepared with 500 units and 1mL of gelatine solution (1%) adjusted to 100 mL with H₂O. Directly before use, this solution was diluted 1:1 in H₂O. ATC and BTC iodides were dissolved in water to a final concentration of 0.075 M. For buffer preparation, potassium dihydrogen phosphate (10 mmol, 1.36g) was dissolved in 100 mL of water. The solution was membrane filtered and adjusted using KOH to pH 8.0 ± 0.1. Stock solutions of the test compounds were prepared in ethanol to give a final concentration of 10⁻⁴ M when diluted to the final volume of 3.32 mL. Based on the activities of each measured compound, a dilution series of at least five different concentrations (normally 10⁻⁴–10⁻⁹ M) was prepared. For measurement, a UV-cuvette containing 3.0 mL of phosphate buffer, 100 µL of the respective enzyme-solution, and 100 µL of the test compound dilution was allowed to stand for 5 min, before 100 µL of DTNB and 20 µL of the substrate solution (ATC/BTC) were added. The solution was mixed immediately, and exactly 2 min after substrate addition the absorption was measured at 412 nm. For the reference value, 100 µL of water replaced the test compound solution. For determining the blank value, 100 µL of water replaced the enzyme solution. Each concentration was measured in triplicate at 25°C. The inhibition curve was obtained by plotting the percentage of enzyme activity (100% for the reference) versus logarithm of test compound concentration. Calculation of the IC₅₀ values was performed with *Graph Pad Prism*TM 4.

Kinetic measurements were performed in the same manner, but reaction time was extended to 4 min after substrate addition. Substrate (BTC) was used in concentrations of 23, 45, 91, 136, 272 and 425 µM for each Inhibitor concentration measured. V_{max} and K_m values according to Michaelis-Menten kinetics were calculated by non-linear regression from substrate-velocity curves (**Figure 1**) using *Graph Pad Prism*TM 4. Linear regression was used to calculate a Lineweaver-Burk plot.

Figure 1:



References

1. Mohr, P.; Decker, M.; Enzensperger, C.; Lehmann, J. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2110.
2. Rasmussen, T. H.; Nielsen, J. B. *Biomarkers* **2002**, *7*, 322.

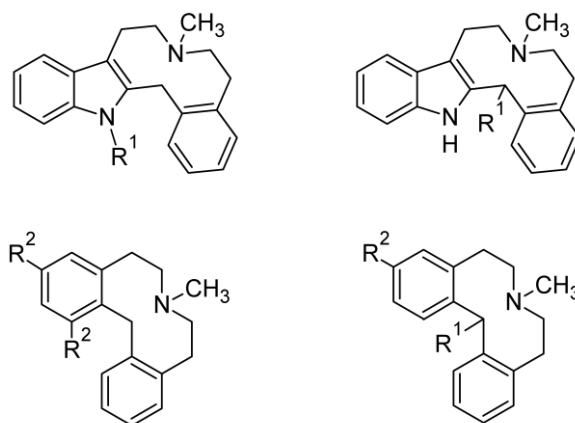
Publikation 5

Exploring the Space Between the Two Pharmacophores: SAR-Studies at Dopamine-Receptors on Dibenz- and Benzindoloazecines with Small Substituents Between the Aromatic Moieties

Maria Schulze, Christoph Enzensperger, Dina Robaa und Jochen Lehmann

Bioorg Med Chem Lett., Manuskript in Vorbereitung.

In dieser Publikation wurde bei *[d,g]*-Azecinen der Raum zwischen den beiden Aromaten untersucht, indem dort kleine Substituenten eingeführt wurden. Um Aussagen zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen machen zu können, wurden sieben neue Strukturen synthetisiert und mit bekannten Molekülen verglichen. Während Substituenten zwischen den Aromaten an D₁- und D₅-Rezeptoren sehr gut toleriert wurden, führten diese Substitutionen bei D₂-, D₃- und D₄-Rezeptoren zum Teil zu drastischen Affinitätsverlusten. Mit Hilfe von *in silico*-Studien konnte nur eine sehr geringe Streckung des Moleküls durch die Einführung der Substituenten zwischen beiden Aromaten nachgewiesen werden, weshalb die unterschiedlichen Affinitäten hauptsächlich auf die Raumbeanspruchung der Substituenten zurückgeführt werden konnten.



$R^1 = \text{Me, Et}$ $R^2 = \text{MeO, OH}$

Graphical Abstract

Eigenanteil: Synthese der Hexahydrodibenzazecin-Derivate sowie des 7,15-Dimethyl-6,7,8,9,14,15-hexahydro-5*H*-indolo[3,2-*f*][3]benzazecins. Interpretation der pharmakologischen Daten. Erstellung des Manuskripts in Zusammenarbeit mit Dr. Christoph Enzensberger.

Exploring the Space Between the Two Pharmacophores: SAR-Studies at Dopamine-Receptors on Dibenz- and Benzindolozecines with Small Substituents Between the Aromatic Moieties

Maria Schulze, Dina Robaa, Jochen Lehmann and Christoph Enzensperger*

Lehrstuhl für Pharmazeutische/Medizinische Chemie, Institut für Pharmazie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Philosophenweg 14, D-07743 Jena, Germany

Received Month XX, 2010; Accepted Month XX, 2010

Abstract Hexahydrodibenzo- and -benzindolozecines are well known antagonists at dopamine receptors and hence might serve as potential neuroleptic compounds. To gain better insights in their active confirmation and the steric environment in the binding pocket we investigated the space between the two aromatic moieties of azecines by adding small substituents between them. Radioligand binding experiments revealed that the D₁ and D₅ receptors tolerated an additional substituent well, whereas affinities at the D₂-like receptors decreased by inserting small substituents. *In silico* studies indicate a slightly straightened shape of the substituted compounds and a longer distance between the two aromatic moieties.

LE300², LE425¹ and LE404² are lead compounds in the field of dopamine /serotonin receptor antagonists with extraordinary high affinities to these receptors. Therefore we used them to perform SAR studies at dopamine receptors by changing very little of the underlying scaffold. Introduction of small residues between the two aromatic moieties of the rather flexible azecine scaffold might give information about two issues: Firstly, the residues can repel the two aromatic moieties from each other and induce a conformational change of the scaffold. Secondly it shows to what extent the binding pocket tolerates steric factors between the two pharmacophores. This is very important, since the high conformational flexibility of the azecines makes it hard to define an active conformation and a crystal structure of the dopamine receptors, as membrane-linked G-Protein-coupled receptors (GPCRs) are not available so far.

In former studies we found, that small alkyl-chains (methyl or ethyl-substituents) at the indole nitrogen of

LE300 (see compounds **1** in **figure 1**) can enhance the affinities toward dopamine receptors, whereas longer chains at this position turned out to be disadvantageous.³ We therefore assumed that residues between the aromatic moieties might bring them into a more favourable orientation to each other or fill out a lipophilic cavity.

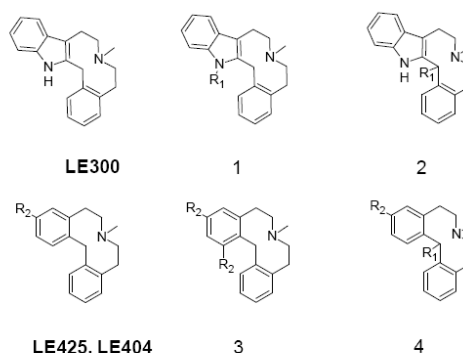


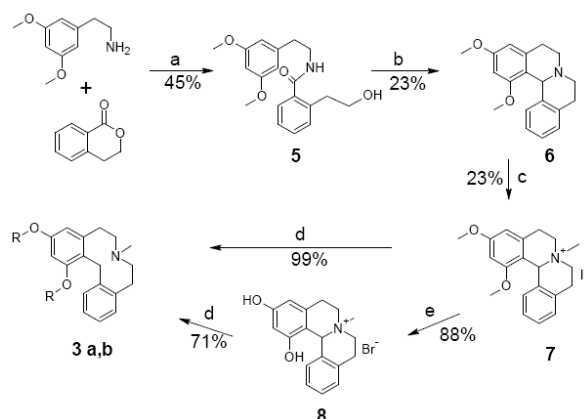
Figure 1 Novel structures with substituents between the aromatics: R₁ = Me → compounds **1a**, **2a**, **4a**; R₁ = Et → compounds **1b**, **2b**, **4b**; R₂ = MeO → compounds **LE425**, **3a**; R₂ = OH, R₁=Me → compounds **LE404**, **3b**, **4c**.

Keywords: Azecine, Dopamine-Receptor, SAR

*Corresponding author. phone: +49-3641-94-9800; fax: +49-3641-94-9802; e-mail: ch.enzensperger@uni-jena.de

In the present work we investigated this theory by synthesis of 1-substituted dibenz[*d,g*]azecine analogues (**3**) and by the development of **LE300**, **LE404** and **LE425** analogues with methyl or ethyl groups at the methylene-bridge between the aromatic pharmacophors (**2,4**, **figure 1**). We compared results of radioligand binding experiments of these and related structures and performed *in silico* studies relying on the x-ray structure and energy minimized conformations of **LE300**.

The synthesis of the 1,3-disubstituted 5,6,7,8,9,14-hexahydro-dibenzo[*d,g*]azecines **3** were performed starting with 1,3-dimethoxy-phenethylamin and isochroman-1-one to form the relating amide. Cyclization was conducted by a *Bischler-Napieralski*-reaction. After methylation with iodomethane, the ring cleavage of the C-N-bond under *Birch*-conditions yielded the desired azecine (**3a**). Compound **3b** was obtained by ether cleavage with hydrobromic acid in glacial acetic acid (**scheme 1**).



Scheme 1. Synthesis of compound **3a** (R=CH₃) and **3b** (R=H); Reagents and Conditions: a) 7d 70°C b) i: POCl₃, acetonitrile, 18h reflux ii: NaBH₄, MeOH, 0.5h 0°C → 60°C c) CH₃I; acetonitrile, 12h rt d) Na, liq. NH₃, 15 min -40°C e) HBr, glacial HAC, 6h reflux

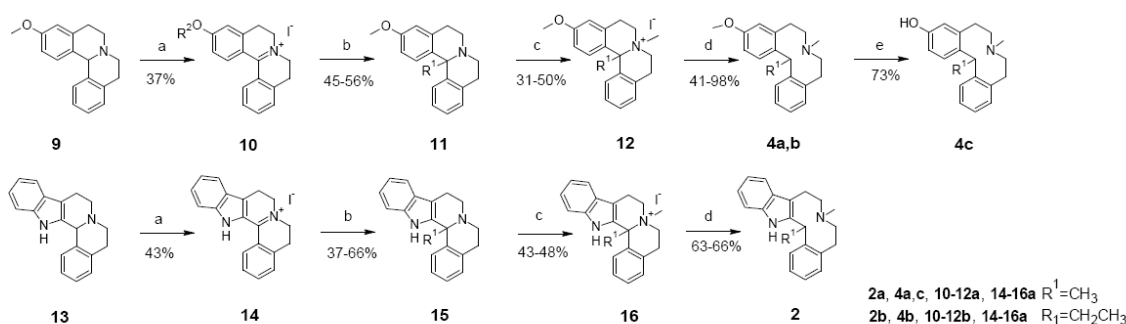
Synthesis of the 14-alkylated dibenz- and benzindolo[*d,g*]azecines was performed in two steps from previously described quinolizine-derivatives. The suitable quinolizine (**9,13**) was oxidized with iodine in ethanol to yield an iminium salt (**10, 14**), which was used for the Grignard reaction followed by *N*-

methylation and cleavage of the C-N-bond to obtain the relative azecine (**2, 4**) (**scheme 2**).

Results of the radioligand binding experiments are outlined in **table 1**. At the D₁-receptor family (D₁, D₅) small substituents between the two aromatic moieties of the azecines **LE300**, **LE404** and **LE425** don't affect the binding of the ligand to the receptor. One or two-digit nanomolar K_i values were determined for all investigated molecules (**1-4**, **17-18**). For some compounds with additional substituents in this area (**1a**, **3a,b**, **4a,b**, **17**), the affinities at D₅ receptors are even increased compared to the compounds with no substituent. In general, the affinities for the D₂ receptor family (D₂-D₄) decrease with the insertion of an additional moiety between the aromatics.

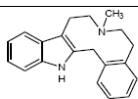
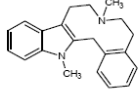
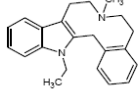
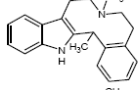
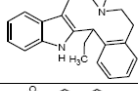
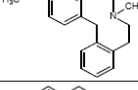
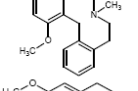
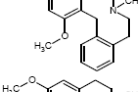
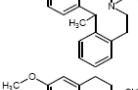
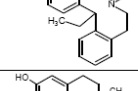
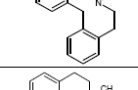
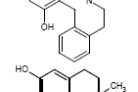
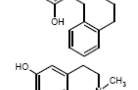
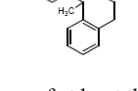
Hence, the two subgroups of dopamine receptors show absolutely different results in this study. Nevertheless, D₂ and D₄ receptors seem to tolerate the small substituents somewhat better than the D₃ receptor, where for some compounds the affinity is almost completely abolished. Surprisingly the methyl group at the indole nitrogen is even advantageous for the binding at D₃ receptors. At D₄ receptors, residues at the aromatic moiety itself are much better tolerated than the small substituents in between them at the methylene bridge. For the D₂ receptor we found the same relation, but only for the benzindolo[*d,g*]azecines (**1,2**) and not for the dibenzo-derivatives (**3,4**). Besides that, the substitution at position 3 of one of the benzene rings of the dibenzazecines seems to be crucial for the binding to D₂ and D₄ receptors. A substitution at position 1 (**17, 18**) leads to lower affinities than the 3-substitution (**LE425**, **LE404**), but compounds with similar substitutions of both positions as **3a,b** show affinities in the mean range of the both mono-substituted derivatives.

We hypothesized that the residues close to both aromatic moieties could change the shape of the whole scaffold and result in conformations where the two aromatic moieties, which turned out to be crucial pharmacophors,⁴ are moved apart. In order to fortify this theory, we performed a computational approach for the benzindoloazecine derivatives using the x-ray structure of LE300xHCl as template for our investigated structures.⁵ From all azecines, only the x-ray structure of LE300 is available.



Scheme 2. Synthesis of compounds **2a, b** and **4a, b, c**; Reagents and Conditions: a) I₂, EtOH, 3.5h reflux b) Mg, alkyl-Br, Ether, THF, 2h reflux, c) CH₃I; acetonitrile, 12h rt d) Na, liq. NH₃, 15 min -40°C e) HBr, glacial HAC, 6h reflux

Tabelle 1. Affinities (K_i values) for dopamine receptor subtypes measured by radioligand binding studies

Compound		K_i [nM] (Radioligand binding studies)				
		D ₁	D _{2L}	D ₃	D _{4.4}	D ₅
LE 300		1.9±0.5 ^a	44.7±15.8 ^a	60.4±6.8 ^a	74.9±39 ^a	7.5±0.3 ^a
1a		1.5±0.8	8.2±5.8	7.2±2.8	13.2±2.9	1.9±2.0
1b		3.4±1.1	41±18	180±66	37±6	7.5±2
2a		49±7	200±32	>10,000	533±45	64±28
2b		50	n.d.	>10,000	298	27
LE 425		28.5±9.7 ^a	13.±9.0 ^a	75±7.3 ^a	43±1.3 ^a	54±20 ^a
17 ^a		7.6±1.5	164±12	1835±290	390±106	8.3
3a		20±1.2	64±27	327±105	46±22	27±14
4a		21±19	15±3.5	152±19	345±37	6.7±1.0
4b		35±11	49±17	576±227	776±115	37±11
LE404 ^a		0.39±0.22	17.5±1.5	47.5±24	11±1	1.5±0.5
18 ^a		8.7±2.0	84.0±2.8	215±84	202±74	n.d.
3b		3.8±0.6	56±17	526±199	104±13	0.8±0.1
4c		6.7±2.9	434±69	3114±652	1488	5.2±1.8

K_i values are means of at least three experiments, performed in triplicate ± SEM; ^a compounds known from lit.¹

In the crystal structure of LE300 (CCDC-199342) and its HCl salt (CCDC-198889) there are two “cage-like” conformations present, which behave like mirror images and have the same energy. So, it is a special kind of planar chirality. In both mirror images the alicyclic *N*-methyl group points towards and not outwards the cage (see supplementary information). Since both

“enantiomers” are affected by the residues between the aromatic moieties in the same manner, we used only one for the further calculations. To investigate the influence of the residues between the aromatic systems of LE300 we used the following workflow in Sybyl-X 1.0 software from Tripos, L.P.

1. Import x-ray structure of LE300xHCl
2. Define centroids around benzene and indole
3. Energy minimization of the structure
4. Measure the distances between the pharmacophors,
5. Sketch the additional residues in the E-minimized x-ray structure of LE300
6. Minimize and measure the distances again.

This approach is reproducible and should indicate whether the residues induce an overall deformation of the cage-like scaffold (**figure 2**, exact values are given in the supporting information).

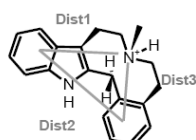


Figure 2. Sketch of the cage like conformation of LE300 in x-ray structure and the investigated distances.

To our surprise, the minimization of the x-ray structure revealed that the conformation of the entire molecule moves further downwards into a local minimum which is about 30 kcal/mol lower in energy than the actual x-ray structure. The indole moves about 0.12 Å towards the protonated nitrogen (Dist1) whereas the benzene largely keeps on its place (Dist3). The distance between the both aromatic moieties (Dist2) is most significantly changed during the minimization, since it is in the x-ray structure for about 0.22 Å wider than in the minimized one.

In our approach we didn't know whether we should sketch the additional groups on the original x-Ray structure and minimize it afterwards or whether we should sketch on the already minimized x-ray structure and re-minimize it.

To be sure, we did both and found no significant difference in the two methods but the distances of the minimized x-ray structure served as reference for all comparisons.

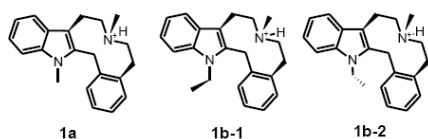


Figure 3. Structures of *N*-substituted derivatives of LE300 used for calculations

Changing the indole *NH* into a indole *N-CH₃* (as in compound **1a**) doesn't affect the distances dramatically after minimization: Dist1 decreases for about 0.1 Å, Dist2 between the aromatic moieties was increases for 0.05 Å and Dist3 also increases for about 0.04 Å. We get nearly the same results when we minimize the already minimized x-ray structure with the attached *N*-methyl group and when we minimized the parent and un-minimized x-ray structure with the attached *N*-methyl group.

The orientation of the ethyl group in compound **1b** could go forth (**1b-1**) or back (**1b-2**) depending on where it was attached before minimization (**figure 3**).

Surprisingly the conformation where the ethyl points inside the cage-like conformation (**1b-1**) is lower in energy than of that, where it points backwards. Regardless the orientation of the ethyl group, the indole and the alicyclic nitrogen (Dist1) are just a bit (~0.07 Å in average) closer to each other compared to LE300. The aromatic moieties (Dist2) move apart for about 0.18 Å in average, which is nearly twice as much as in the methylated counterpart. Distance (Dist3) is comparable with that in the methylated compound (**1a**). Again there is no big difference whether or not the attachment of the group is done on the minimized x-ray structure or the parent one.

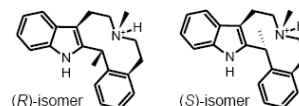


Figure 4. Enantiomers of compound **2a** used for calculations

Methylation between the both aromatic moieties in compound **2a** results in two stereo-isomers (**figure 4**). In the (*R*)-isomer where the methyl group points "down" and in the (*S*)-isomer, the methyl group points rather up or rearwards the molecule. The (*S*)-isomer where the methyl points rearwards the molecule has a 5.3 kcal higher energy than the (*R*)-isomer. The distance between the indole and the scaffold nitrogen (Dist1) is slightly diminished compared to LE300. This is the same effect we observed for the alkylation of the indole nitrogen. For the (*S*)-isomer this effect is with ~0.2 Å more distinct than for the (*R*)-isomer (~0.04 Å). The distance between the aromatic moieties (Dist2) behaves for both isomers in opposite ways. It is for the (*S*)-isomer slightly (0.016 Å) increased whereas it is for the (*R*)-isomer even for 0.027 Å decreased. In the case of an 1:1 composition of both isomers, we could take the average between (*S*)- and (*R*)-isomer ending up in an overall decrease of about 0.01 Å. All in all, the distances are not really influenced much by the introduction of a methyl group between the both aromatic moieties.

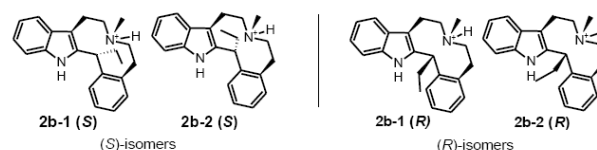


Figure 5. Enantiomers of compound **2b** used for calculations

Ethylation again can be done in two positions and furthermore, the ethyl-chain can move either towards the indole or towards the benzene, yielding in a total of at least 4 possible conformations for compound **2b** (**figure 5**). Each one is calculated starting with the parent LE300 x-ray prior to minimization and with the minimized x-ray structure. As seen for the methylation, the (*S*)-isomer (where the chain points backwards) is always ~5 kcal/mol higher in energy. For the (*R*)-isomer (chain points downwards), the conformation where the chain points to the indole (**2b-2(R)**) seems to be slightly favoured in terms of energy (0.45 kcal/mol). There is a distinct difference in some distances between the

conformations of **2b-1** and **2b-2**: So the distance (Dist1) between the indole and the basic *N* is in the conformation where the chain points towards the indole (**2b-2**) for 0.021 Å longer compared to LE300 whereas the same distance for the conformation where the chain points to the benzene (**2b-1**), is about 0.048 Å shorter. In average this results in a slight shortening for about 0.02 Å.

The distance between the indole and the benzene (Dist2) at the (*R*)-isomer also depends on the direction the ethyl chain points: When it points towards the indole (**2b-2(R)**), it is about 0.04 Å shorter, and in the other case for compound **2b-1(R)**, it is 0.066 Å longer. In average it results in an elongation of ~0.02 Å. The distance between the benzene and the basic nitrogen (Dist3) is for **2b-2(R)** very slightly (0.01 Å) longer compared to the minimized LE300 and for the other conformation (**2b-1(R)**), it is slightly (0.02 Å) shorter. In average it is probably slightly shorter or remains the same.

For the (*S*)-isomer where the chain points rearwards the molecule (xxx), things are much clearer: Dist1 between indole and the alicyclic *N* always diminished, in average for 0.18 Å. The two aromatic moieties (Dist2) are always more distant to each other. The average is 0.021 Å. The distance between the benzene and the basic nitrogen (Dist3) is for both chain-directions slightly (average 0.06 Å) enhanced. Considering the fact that the (*S*)-enantiomer of the ethylated compound is in terms of energy less favoured, even ethylation between the two aromatic moieties does not change the distances to a high extend.

Table 2. Results of the distance measurements in energy minimized conformations compared to LE300

compound	Dist1 changes [Å]	Dist2 changes [Å]	Dist3 changes [Å]
1a	decrease 0.1	increase 0.05	increase 0.04
1b-1	decrease 0.09	increase 0.1	increase 0.04
1b-2	decrease 0.05	increase 0.2	increase 0.04
2a (<i>R</i>)	decrease 0.04	decrease 0.03	increase 0.01
2a (<i>S</i>)	decrease 0.2	increase 0.02	increase 0.07
2b-1 (<i>R</i>)	increase 0.02	increase 0.07	decrease 0.02
2b-1 (<i>S</i>)	decrease 0.2	increase 0.01	increase 0.06
2b-2 (<i>R</i>)	decrease 0.05	decrease 0.04	increase 0.01
2b-2 (<i>S</i>)	decrease 0.2	increase 0.03	increase 0.06

Taking all results together, compared to the minimized x-ray structure of LE300, the distance between the indole moiety and the azecine-nitrogen (Dist1) decreases with substituents between the aromatic rings and the distance between the benzene and the azecine nitrogen (Dist2) increases. As expected the two aromatic moieties move apart from each other (Dist3). Nevertheless, the conformations do not change dramatically (**table 2**). This could explain why all compounds with substituents between the two aromatic moieties show still good affinities to D₁, D₅ receptors.

It can be summarized that substituents between the aromatic moieties do not change affinities to D₁/D₅-receptors, but decrease affinities to D₂-like receptors. Substituents at the aromatic moieties are better tolerated by D₂ and D₄ receptors than substituents at the methylen bridge. At D₃ receptors all substitutions except *N*-methylation of LE300 lead to a dramatic decrease of affinities. *In silico* studies revealed a slight elongation of the distance between the aromatic moieties and hence a less flexed conformation. Nevertheless, the changes are only marginal and it is more likely that the additional required space of the substituents is crucial for the interaction with the receptor.

Supporting information

Supporting information, including syntheses, spectral data of target compounds, description of pharmacological assays and detailed information on the *in silico* studies is available online.

Acknowledgments:

The authors would like to thank Franziska Müller, Petra Wiecha and Bärbel Schmalwasser for the reliable technical assistance in performing the radioligand binding assays. Furthermore the financial support by DFG project (EN 875/1-1) and DAAD is appreciated.

References

- Mohr, P.; Decker, M.; Enzensperger, C.; Lehman, J. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2110.
- Witt, T.; Hock, F. J.; Lehmann, J. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2079.
- Robaa, D.; Kretschmer R.; Siol O.; AbulAzam S.; ElKhawass E.; Lehmann, J.; Enzensperger, Ch. *Arch. Pharm.* **2010**, submitted.
- Hoefgen, B.; Decker, M.; Mohr, P.; Schramm, A. M.; Rostom, S. A.; El-Subbagh, H.; Schweikert, P. M.; Rudolf, D. R.; Kassack, M. U.; Lehmann, J. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 760.
- Decker, M.; Schleifer, K. J.; Niegel, M.; Lehmann, J. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, *39*, 481.

Supporting Information

Exploring the Space Between the Two Pharmacophores: SAR-Studies at Dopamine-Receptors on Dibenz- and Benzindolo-azecines with Small Substituents Between the Aromatic Moieties

*Maria Schulze, Dina Robaa, Jochen Lehmann and Christoph Enzensperger**

The supporting Information contains detailed experimental procedures for the pharmacological investigations (radioligand binding studies and functional Ca-assay), the synthesis and analytical data (NMR, elemental analysis) of the substances and data of the *in silico* studies.

Pharmacological investigations**Radioligand-Binding****Cell Culture**

Human D₁, D_{2L}, D₃, D_{4.4} and D₅ receptors were stably expressed in Chinese hamster ovary (CHO) cells or human embryonic kidney cells (HEK293). D₁, D_{2L}, D₃, and D₅ were expressed in HEK cells and D_{4.4} receptors were expressed in CHO cells, respectively. Cells were grown at 37°C under an atmosphere of 5% CO₂: 95% air in HAM/F12-medium (Sigma-Aldrich) for CHO cells and Dulbecco's modified Eagles Medium Nutrient mixture F-12 Ham for HEK293 cells, each supplemented with 10% fetal bovine serum, 1 mM L-glutamine and 0.2 µg/mL of G 418 (all from Sigma-Aldrich).

Preparation of Whole-Cell-Suspension¹

Human D₁, D_{2L}, D₃, D₄ and D₅ receptor cell lines were grown on T 175 culture dishes (Greiner bio-one, Frickenhausen) to 85% confluence. The medium was removed and the cells were incubated with 3 mL trypsin-EDTA-solution (Sigma-Aldrich) to remove the cells from the culture dish. After incubation, cells were suspended in 6 mL medium in order to stop the effect of trypsin-EDTA-solution. The resulting suspension was centrifuged (483 RCF, 4°C, 4 min.). The pellet was re-suspended in 20 mL of ice-cooled PBS (Phosphate-buffered saline: 137 mM NaCl, 2.7 mM, 8.1 mM Na₂HPO₄ and 1.4 mM KH₂PO₄) and again centrifuged to obtain a pellet. This procedure was repeated once before the resulting pellet was suspended in 12 mL of buffer (5 mM magnesium chloride, 50 mM TRIS-HCl, pH=7.4). This resulting suspension was directly used for the radioligand binding assay.

Radioligand Binding Assay

The binding studies were performed following the protocol previously described but in 96- well format.³ The assays with the whole-cell-suspension were carried out in triplicate in a volume of 550 µL (final concentration): TRIS-Mg²⁺-buffer (345 µL), [³H]-ligand (50 µL), whole-cell-suspension (100 µL) and appropriate drugs (55 µL). Non-specific binding was determined using fluphenazine (100 µM) for D₁ and D₅ tests and haloperidol (10 µM) for D₂, D₃ and D₄ tests. The incubation was initiated by addition of the radioligand and was carried out in 96 deep well plates (Greiner bio-one, Frickenhausen) using a thermocycler (Thermocycler comfort®, Eppendorf, Wessling) at 27°C. The incubation was terminated after 90 min by rapid filtration with a PerkinElmer Mach III Harvester™ using a PerkinElmer Filtermat A, previously treated with a 0.25% polyethyleneimine-solution (Sigma-Aldrich) and washed with water. The filtermat was dried for 3 min at 400 watt using a microwave oven (MW 21, Clatronic, Kempen). The dry filtermat was placed in a filter plate (Omni filter plates™,

PerkinElmer Life Sciences) and each field of the filtermat moistened with 50 μ L Microscint 20TM scintillation cocktail. The radioactivity retained on the filters was counted using a Top Count NXTTM microplate scintillation counter (Packard, Ct., USA). For determining the K_i values at least two independent experiments each in triplicate were performed.

The competition binding data were analyzed with GraphPad PrismTM software using nonlinear regression with sigmoidal dose response equation. For calculating of mean, standard deviation and standard error of the mean the software Microsoft ExcelTM was used. K_i values were calculated from IC_{50} values applying the equation of Cheng and Prusoff.²

Functional assay: Measuring intracellular Ca^{2+} with a fluorescence microplate reader^{3;4}

Cell Culture

Human D_1 and D_{2L} receptors were stably expressed in human embryonic kidney cells (HEK293) and cultured as mentioned above.

Preparation of Whole-Cell-Suspension

Human D_1 and D_{2L} receptor cell lines were grown on T 175 culture dishes (Greiner bio-one, Frickenhausen) to 85-90% confluence. The medium was removed via a suction apparatus and cells rinsed twice with 6 mL Krebs-HEPES buffer (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM $MgSO_4$, 1.2 mM KH_2PO_4 , 4.2 mM $NaHCO_3$, 11.7 mM D-Glucose, 1.3 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES, pH 7.4) each time. After these two washes, cells were loaded with 3 μ L of a 0.5 M Oregon GreenTM 488 BAPTA-1/AM-solution (Molecular Probes, Eugene, OR) (in DMSO) in 6 mL of Krebs-HEPES buffer containing 3 μ L of a 20% Pluronic F-127-solution (Sigma Aldrich) (in DMSO) for 45 min at 37°C. After 35 min incubation, the culture dish was rapped slightly in order to remove all cells from the dish for further incubation. To this cell suspension 5 mL of Krebs-HEPES buffer were added again to rinse all cells from the plate. Then the resulting suspension portioned in ten 1.5 mL Eppendorf caps and centrifuged at 10640 RCF for 10 seconds. The supernatant buffer was removed and the resulting ten pellets are divided in 2 portions à 5 pellets, which are suspended, in 1 mL of Krebs-HEPES buffer, each. The two suspensions are centrifuged again for 10 sec. After removing the buffer, the two pellets were combined and re-suspended in 1 mL buffer, diluted with 17 mL of Krebs-HEPES buffer and plated into 96-well plates (OptiPlate HTRF-96TM, Packard, Meriden, CT; Cellstar, Tissue Culture Plate, 96W, Greiner bio-one, Frickenhausen). Microplates were kept at 37°C under an atmosphere including 5% CO_2 for 30 min before they were used for the assay.

Calcium Assay³

Screening for agonistic and antagonistic activity was performed using a NOVOstar microplate readerTM (BMG LabTechnologies) with a pipettor system. Agonistic activities were tested by injecting 20 μ L buffer alone as negative control, standard agonist in buffer as positive control, and test compounds in buffer in rising concentrations, respectively, each into separate wells. Fluorescence measurement started simultaneously to the automatic injection. SKF 38393 was used as standard agonist for D_1 receptors and quinpirole for D_2 receptors (final concentration: 1 μ M).

Screening for antagonistic activities was performed by pre-incubating the cells with 20 μ L of the test compound dilutions (final concentrations: 100 μ M, 50 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M, 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 0,1 nM) at 37°C 30 min prior to injection of 20 μ L standard agonist per well. As standard agonists we used SKF38393 for D_1 and quinpirole for D_2 receptors, respectively. Fluorescence measurement also started simultaneously to the automatic injection. At least two independent experiments each in four or six replications were performed.

Fluorescence intensity was measured at 520 nm (bandwidth 25nm) for 30 s at 0.4 s intervals. Excitation wavelength was 485 nm (bandwidth 20 nm). Agonistic or antagonistic activities were assessed by a dose response curve obtained by determination of the maximum fluorescence intensity of each data set and nonlinear regression with sigmoidal dose response equation using GraphPadPrism™ 3.0.

Syntheses

General methods: Melting points are uncorrected and were measured in open capillary tubes, using a Gallenkamp melting point apparatus. ¹H and ¹³C-NMR spectral data were obtained from a Bruker Advance 250 spectrometer and Advance 400 spectrometer, respectively. Elemental analyses were performed on a Hereaus Vario EL apparatus.

General procedures:

Oxidation of the tetrahydro-quinolizine to the iminiumsalt

The appropriate tetrahydro-quinolizine derivative **9**, **13** resp. (1 mmol) and iodine (1 g, 4 mmol) were dispensed in ethanol (70 mL) and the mixture was refluxed under nitrogen for 3.5 h. The solvent was removed *in vacuo* before saturated thio sulphate solution was added until the colour of the mixture changed from red to yellow. The product was extracted with chloroform (3 x 50 mL). The combined organic layers were dried over sodium sulphate, filtrated and evaporated to dryness to obtain the crude product which was crystallized in a small amount of ethanol.

Grignard reaction

A 50-mL three-neck flask equipped with a drying tube, reflux condenser and thermometer was cooled with an ice-bath. Mg-turnings (1.2 g, 50 mmol) and 2.5 mmol of the alkyl-halogenide (iodo methane or ethyl bromide), suspended in 5 mL of dry diethyl ether were added and stirred until the solvent became cloudy. A solution of 47.5 mmol of the appropriate quinolizine in dry diethyl ether was added dropwise. The ice bath was removed and the mixture refluxed for 30 min under nitrogen. The iminiumsalt (1.5 mmol), suspended in 15 mL of dry THF was added and the mixture was refluxed for another 2 h, before the reaction was stopped by drop wise addition of 5 mL of water. The mixture was diluted with 20 mL of water and 20 mL diethyl ether. The phases were separated. The organic phase was washed with water (2x50 mL), dried over sodium sulphate and the solvent was removed *in vacuo*. The crude product was purified by recrystallization in methanol or by column chromatography.

Quaternisation with methyl iodide

A 10-fold molar excess of methyl iodide was added to a stirred solution of the respective quinolizine in acetonitrile. The mixture was stirred for 48 h at room temperature under nitrogen. The precipitated solids were isolated by filtration, washed with little acetonitrile and dried *in vacuo*.

Ring Opening - Birch reaction

A 100-mL three-neck flask equipped with a balloon as an overflow tank was cooled in a liquid nitrogen bath. Ammonia was condensed into this flask until it was $\frac{3}{4}$ filled. The cooling bath was removed and the ammonia was allowed to liquefy. After suspending 1 mmol of the quaternary salt, rice-grain-sized pieces of sodium were added to the stirred mixture until the developing blue colour remained for 10-15 min. The mixture was quenched with 1-2 drops of saturated aqueous NH₄Cl. The

ammonia was evaporated under a stream of nitrogen. The residue was portioned between ether and water and was stirred until two phases formed. The aqueous phase was extracted with ether (3 x 15 mL) and the pooled organic phases were dried over MgSO₄ and evaporated to yield the ring open compound.

Ether Cleavage of Methoxylated Compounds

The methoxy compound was dissolved in a mixture of 20 mL of glacial acetic acid and 10 mL aqueous HBr (48%) and refluxed under nitrogen for 5 h. The solvents were removed *in vacuo* and the residue was crystallized from methanol/diethyl ether.

N-[2-(3,5-Dimethoxyphenyl)ethyl]-2-(2-hydroxyethyl)benzamide (5)

A mixture of 3,5-dimethoxyphenethylamine (Trans World Chemicals, Braunschweig) (0.02 mol) and 1-isochromanone (preparation see Ref⁵). (0.022 mol) was stirred at 70 °C under nitrogen for 7 d. After cooling down to room temperature, the amide crystallized in little ethyl acetate as yellowish solid. Yield: 45%, MP.: 102 °C. ¹H (250MHz, DMSO) δ 2.74-2.81 (q, *J*=6,7 Hz, 4H, Ph-CH₂); 3.45-3.50 (q, *J*=6,0 Hz, 2H, Ph-CH₂-CH₂-OH); 3.55-3.58 (m, 2H, Ph-CH₂-CH₂-NH); 3.71 (s, 6H, O-CH₃); 4.80 (s, 1H, NH); 6.32-6.33 (q, *J*=2,2 Hz, 1H, C4); 6.41-6.42 (q, *J*=2,2 Hz, 2H, C2, C6); 7.18-7.45 (m, 4H, arom. H). ¹³C, dept (100MHz, DMSO) δ 35.65; 36.55; 55.48 (O-CH₃); 62.62; 98.60 (C2); 107.09 (C4; C6); 126.15; 127.56; 129.62; 130.78; 137.59 (quat.); 137.93 (quat.); 142.19 (quat.); 160.74 (C1); 160.85 (C3); 169.57 (CONHR). Anal. calcd. for C₁₉H₂₃NO₄: C 69.28%, H 7.04%, N 4.25%; found: C 69.19%, H 7.01%, N 4.15%.

1,3-Dimethoxy-5,8,9,13b-tetrahydro-6H-isoquino[1,2-a]isoquinoline (6)

The amide **5** (0.005 mol) was dissolved in a mixture of 40 mL acetonitrile and 5 mL POCl₃. The solution was refluxed for 18 hrs. The solvents were removed *in vacuo* and the resulting brown oil washed with 2x20 mL of petroleum ether. The residue was dissolved in 40 mL methanol and cooled to 0°C in an ice bath. NaBH₄ (6 g) was added in small portions to the cooled reaction mixture. The cooling was removed and the suspension refluxed for 0.5 h. After careful evaporation of the solvent, the residue was dissolved in water and extracted with ethyl acetate. The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated *in vacuo*. The resulting yellow oil was crystallized from methanol. Yellow powder, yield: 23%, MP.: 151 °C. ¹H (250MHz, CDCl₃) δ 2.64-3.18 (m, 6H); 3.23-3.32 (m, 1H); 3.60-3.81 (m, 1H); 3.81 (s, 6H, O-CH₃); 5.31 (s, 1H, C14); 6.30-6.31 (d, *J*=2.3 Hz, 1H, C2); 6.40-6.41 (d, *J*=2.3 Hz, 1H, C4); 6.78-6.81 (d, *J*=7.5 Hz, 1H, C13); 7.01-7.07 (m, 3H, C10, 11, 12). ¹³C, dept (100MHz, CDCl₃) δ 23.75; 29.58; 43.23; 51.32; 55.08 (CH or CH₃); 55.25 (CH or CH₃); 55.28 (CH or CH₃); 96.03; 104.80; 119.16 (quat.); 125.83; 126.09; 128.53; 128.68; 133.96 (quat.); 136.40 (quat.); 137.00 (quat.); 157.61 (quat.); 159.37 (quat.). Anal. calcd. for C₁₉H₂₁NO₂ x ²/₉CHCl₃: C 71.72%, H 6.65%, N 4.35%; found: C 71.38%, H 6.97%, N 4.66%.

1,3-Dimethoxy-7-methyl-5,8,9,13b-tetrahydro-6H-isoquino[1,2-a]isoquinolinium iodide (7)

Yellow powder, yield: 99 %, MP.: 239 °C. ¹H (250MHz, CDCl₃) δ 3.15 (s, 3H, N-CH₃); 3.24-3.71 (m, 6H); 3.78 (s, 3H, O-CH₃); 3.86 (s, 3H, O-CH₃); 3.86-3.99 (m, 1H); 4.14-4.26 (m, 1H); 5.92 (s, 1H, C14); 6.55-6.56 (d, *J*=2.0 Hz, 1H, C2); 6.67-6.68 (d, *J*=2.0 Hz, 1H, C4); 6.71-6.74 (d, *J*=7.9 Hz, 1H, C13); 7.14-7.33 (m, 3H, C10, 11, 12). ¹³C, dept (63MHz, CDCl₃) δ 23.55; 23.63; 49.23 (N-CH₃); 51.09; 54.70 (O-CH₃); 54.96 (O-CH₃); 61.85 (C14); 64.78; 97.14; 104.91; 110.78 (quat.); 127.11; 127.93; 128.23; 128.42; 130.22 (quat.); 130.72 (quat.); 131.78 (quat.); 158.38 (quat.); 161.78 (quat.). Anal. calcd. for C₂₀H₂₄INO₂ x H₂O: C 52.76%, H 5.76%, N 3.08%; found: C 52.30%, H 5.34%, N 3.46%.

1,3-Dihydroxy-7-methyl-5,8,9,13b-tetrahydro-6H-isoquino[1,2-a]isoquinolinium bromide (8)

Off-white crystals, yield: 88%, MP.: 215 °C. ^1H (250MHz, methanol- d_4) δ 2.86 (s, 3H, N-CH $_3$); 3.06-3.63 (m, 6H); 3.61-3.84 (m, 2H); 4.09 (s, 2H, C14); 6.16-6.17 (d, $J=2.5$ Hz, 1H, C2); 6.29-6.30 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, C4); 7.08-7.17 (m, 3H, arom. H); 7.29-7.35 (m, 1H, arom. H). ^{13}C , spect (63MHz, DMSO) δ 29.38; 33.55; 34.67; 48.07 (N-CH $_3$); 60.95; 65.35 (C14); 101.01 (C4); 108.33 (C2); 118.49; 125.80; 125.81; 130.19; 130.89; 140.58; 142.13; 142.89; 156.15; 156.67. Anal. calcd. for C $_{18}$ H $_{20}$ BrNO $_2$ x HBr: C 48.78%; H 4.78%, N 3.16%, found: C 49.01%, H 4.55%, N 2.99%.

1,3-Dimethoxy-7-methyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo[*d,g*]azecine (3a)

The crude product was dissolved in little isopropanol and few drops of ethereal HCl were added. The HCl-salt precipitated by further addition of diethyl ether. The HCl-salt was filtered off and dried *in vacuo*. White powder, yield: 99%, MP.: 211 °C. ^1H (250MHz, methanol- d_4) δ 2.89 (s, 3H, N-CH $_3$); 3.21-3.32 (m, 4H); 3.47-3.78 (m, 4H); 3.78 (s, 3H, O-CH $_3$); 3.81 (s, 3H, O-CH $_3$); 4.13 (s, 2H, C14); 6.42-6.43 (d, $J=2.5$ Hz, 1H, C2); 6.48-6.49 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, C4); 7.13-7.17 (m, 3H, arom. H); 7.54-7.58 (m, 1H, arom. H). ^{13}C , dept (63MHz, methanol- d_4) δ 27.30; 28.18; 44.25 (N-CH $_3$); 54.39 (O-CH $_3$); 54.61 (O-CH $_3$); 56.34; 56.95; 97.43; 106.09; 120.41 (quat.); 126.51; 126.93; 129.89; 131.49; 135.12 (quat.); 137.46 (quat.); 139.92 (quat.); 159.05 (quat.); 159.62 (quat.). Anal. calcd. for C $_{20}$ H $_{26}$ ClNO $_2$ x 1/6 H $_2$ O: C 68.46%, H 7.56%, N 3.99%; found: C 68.42%, H 7.54%, N 3.93%.

7-Methyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo[*d,g*]azecine-1,3-diol (3b)

The crude product was dissolved in little isopropanol and few drops of ethereal HCl were added. The HCl-salt precipitated by further addition of diethyl ether. The HCl-salt was filtered off and dried *in vacuo*. Off-white powder, yield: 71%, MP.: 185 °C. ^1H (250MHz, methanol- d_4) δ 2.86 (s, 3H, N-CH $_3$); 3.06-3.63 (m, 6H); 3.61-3.84 (m, 2H); 4.09 (s, 2H, C14); 6.16-6.17 (d, $J=2.5$ Hz, 1H, C2); 6.29-6.30 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, C4); 7.08-7.17 (m, 3H, arom. H); 7.29-7.35 (m, 1H, arom. H). ^{13}C (63MHz, DMSO) δ 29.38; 33.55; 34.67; 48.07; 60.95; 65.35; 101.01; 108.33; 118.49; 125.80; 125.81; 130.19; 130.89; 140.58; 142.13; 142.89; 156.15; 156.67. Anal. calcd. for C $_{18}$ H $_{22}$ ClNO $_2$ x MeOH: C 64.85%, H 7.45%, N 3.89%; found: C 64.91%, H 7.28%, N 3.62%.

3-Methoxy-5,6,8,9-tetrahydroisoquino[1,2-a]isoquinolinium iodide (10)

Crystallized in ethanol. Yellow crystals, yield: 25%, MP.: 234 °C. ^1H (250MHz, DMSO) δ 3.15-3.21 (t, $J=6.7$ Hz, 4H); 3.93 (s, 3H, O-CH $_3$); 4.03-4.11 (q, $J=6.7$ Hz, 4H); 7.09-7.10 (dd, $J=2.7, 8.8$ Hz, 1H, C2); 7.20-7.21 (d, $J=2.7$ Hz, 1H, C4); 7.53-7.68 (m, 4H, arom. H); 7.77-7.84 (m, 1H, arom. H). ^{13}C (63MHz, DMSO) δ 26.30; 26.45; 50.51; 50.75; 56.69; 113.77; 114.54; 118.08; 125.51; 127.79; 128.90; 133.01; 135.64; 135.75; 139.97; 142.87; 165.65; 165.99. calcd for C $_{18}$ H $_{18}$ INO $_2$ x 1/5 CHCl $_3$: C 52.66%, H 4.42%, N 3.37%; found: C 52.86%, H 4.09%, N 3.13%.

3-Methoxy-13b-methyl-5,8,9,13b-tetrahydro-6H-isoquino[1,2-a]isoquinoline (11a)

Recrystallized in methanol. Red needles, yield: 56%, MP.: 57 °C. ^1H (400MHz, CDCl $_3$) δ 1.90 (s, 3H, C-CH $_3$); 2.86-3.03 (m, 4H); 3.09-3.18 (m, 2H); 3.45-3.60 (m, 2H); 3.79 (s, 3H, O-CH $_3$); 6.65-6.66 (d, $J=2.7$ Hz, 1H, C1); 6.74-6.77 (dd, $J=2.7, 8.7$ Hz, 1H, C2); 7.10-7.17 (m, 3H, arom. H); 7.38-7.40 (m, 2H, arom. H). ^{13}C , dept (100MHz, CDCl $_3$) δ 26.02; 26.89; 30.67 (C-CH $_3$); 46.44; 46.54; 55.16 (O-CH $_3$); 60.62 (quat.); 111.62; 113.93; 125.57; 126.37; 127.80; 129.12; 132.84 (quat.); 133.26 (quat.); 134.98 (quat.); 140.93 (quat.); 157.91 (quat.). Anal. calcd. for C $_{19}$ H $_{22}$ ClNO x 4/3 H $_2$ O: C 67.15%, H 7.32%, N 4.12%; found: C 67.50%, H 7.09%, N 3.90%.

3-Methoxy-7,13b-dimethyl-5,8,9,13b-tetrahydro-6H-isoquino[1,2-a]isoquinolinium iodide (12a)

Yellow crystals, yield: 50%, MP.: 148 °C. ^1H (250MHz, CDCl_3) δ 2.15 (s, 3H, C-CH $_3$); 3.20-3.51 (m, 4H); 3.40 (s, 3H, N-CH $_3$); 3.81 (s, 3H, O-CH $_3$); 4.34-4.42 (m, 2H); 6.77-6.78 (d, $J=2.7$ Hz, 1H, C1); 6.81-6.89 (m, 1H, arom. H); 7.24-7.31 (m, 5H, arom. H). ^{13}C (100MHz, CDCl_3) δ 24.00; 24.35; 26.51; 47.18; 55.60; 73.53; 113.99; 114.23; 127.72; 129.06; 129.81; 159.80. Anal. calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{ClNO} \times 2 \text{H}_2\text{O}$: C 53.51%, H 6.41%, N 2.97%; found: C 53.49%, H 6.26%, N 3.06%.

3-Methoxy-7,14-dimethyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo[d,g]azecine (4a)

The crude product was dissolved in little isopropanol and few drops of ethereal HCl were added. The HCl-salt precipitated by further addition of diethyl ether. The HCl-salt was filtered off and dried *in vacuo*. White crystals, yield: 98%, MP.: 185 °C. ^1H (250MHz, CDCl_3) δ 1.59-1.62 (d, $J=6.9$ Hz, 3H, C-CH $_3$); 2.82-2.84 (d, $J=4.0$ Hz, 3H, N-CH $_3$); 3.13-3.25 (m, 4H); 3.44-3.47 (m, 2H); 3.73 (s, 3H, O-CH $_3$); 3.91-4.03 (m, 2H); 4.66-4.68 (q, $J=6.9$ Hz, 1H, C14); 6.58-6.59 (d, $J=2.5$ Hz, 1H, C1); 6.77-6.81 (dd, $J=2.3, 8.8$ Hz, 1H, C2); 7.06-7.27 (m, 3H, arom. H); 7.42-7.45 (d, $J=8.6$ Hz, 1H, C3); 7.50-7.53 (d, $J=7.7$ Hz, 1H, C5). ^{13}C (100MHz, CDCl_3) δ 23.67; 29.66; 35.10; 45.06; 55.23; 56.39; 56.55; 113.06; 115.31; 126.73; 127.47; 127.79; 128.74; 129.94; 135.27; 136.65; 136.76; 144.82; 158.05. Anal. calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{ClNO} \times \text{H}_2\text{O}$: C 68.65%, H 8.07%, N 4.00%; found: C 69.01%, H 8.24%, N 3.82%.

7,14-Dimethyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo[d,g]azecin-3-ol (4c)

The crude product was dissolved in little isopropanol and few drops of ethereal HCl were added. The HCl-salt precipitated by further addition of diethyl ether. The HCl-salt was filtered off and dried *in vacuo*. White powder, yield: 73%, MP.: 149 °C. ^1H (250MHz, Methanol- d_4) δ 1.60-1.63 (d, $J=6.9$ Hz, 3H, C-CH $_3$); 3.10 (s, 3H, N-CH $_3$); 3.21-3.32 (m, 4H); 3.45-3.55 (m, 4H); 4.51-4.64 (q, $J=6.9$ Hz, 1H, C14); 6.61-6.62 (d, $J=2.7$ Hz, 1H, C2); 6.65-6.75 (m, 1H, C4); 7.15-7.31 (m, 3H, arom. H); 7.39-7.42 (d, $J=8.6$ Hz, 1H, arom. H); 7.59-7.62 (d, $J=7.9$ Hz, 1H, arom. H). Anal. calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{ClNO} \times \text{H}_2\text{O}$: C 67.94%, H 7.80%, N 4.17%; found: C 68.03%, H 7.70%, N 3.98%.

13b-Ethyl-3-methoxy-5,8,9,13b-tetrahydro-6H-isoquino[1,2-a]isoquinoline (11b)

Purified by column chromatography (CHCl_3 /methanol 9:1). Red powder, yield: 45%, MP.: 113 °C. ^1H (400MHz, CDCl_3) δ 0.78-0.81 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, C-CH $_2$ -CH $_3$); 2.17-2.23 (q, $J=7.3$ Hz, 2H, C-CH $_2$ -CH $_3$); 2.84-3.10 (m, 4H); 3.16-3.44 (m, 4H); 3.85 (s, 3H, O-CH $_3$); 6.65-6.66 (d, $J=2.8$ Hz, 1H, C4); 6.73-6.76 (m, 1H, arom. H); 7.09-7.19 (m, 5H, arom. H). ^{13}C , dept (100MHz, CDCl_3) δ 7.82 (C-CH $_2$ -CH $_3$); 25.64; 26.55; 29.21; 45.37; 54.62 (O-CH $_3$); 63.87 (C13b); 110.94; 113.55; 124.85; 125.57; 127.41; 128.71; 129.10; 131.96 (quat.); 134.20 (quat.); 136.02 (quat.); 140.40 (quat.); 157.65 (quat.). Anal. calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NO}$: C 81.80; H 7.71; N 4.80; found: C 81.87%; H 7.90%; N 4.77%.

13b-Ethyl-3-methoxy-7-methyl- 5,8,9,13b-tetrahydro-6H-isoquino[1,2-a]isoquinolinium iodide (12b)

Orange foam, yield: 31%, MP.: 86 °C. ¹H (400MHz, CDCl₃) 0.93-0.97 (t, *J*=7.4 Hz, 3H, C-CH₂-CH₃); 2.60-2.65 (q, *J*=7.4 Hz, 2H, C-CH₂-CH₃); 3.20-3.37 (m, 4H); 3.37 (s, 3H, N-CH₃); 3.82 (s, 3H, O-CH₃); 4.40-4.46 (m, 4H); 6.74-6.80 (m, 2H, arom. H); 7.03-7.35 (m, 5H, arom. H). ¹³C, dept (100MHz, CDCl₃) δ 13.03 (C-CH₂-CH₃); 24.00; 24.11; 29.15; 48.00 (N-CH₃); 55.41 (O-CH₃); 56.88; 56.89; 76.81 (C13b); 113.60; 114.20; 129.35; 159.55 (quat.); 159.92 (quat.); 160.11 (quat.). Anal. calcd for C₂₁H₂₆INO x 2/5 CH₂Cl₂: C 54.77%, H 5.76%, N 2.98%; found: C 54.52%, H 6.00%, N 2.75%.

13b-Ethyl-3-methoxy-7methyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo[*d,g*]azecine (4b)

The crude product was dissolved in little isopropanol and few drops of ethereal HCl were added. The HCl-salt precipitated by further addition of diethyl ether. The HCl-salt was filtered off and dried *in vacuo*. White crystals, yield: 41%, MP.: 264 °C. ¹H (250MHz, CDCl₃) δ 0.82-0.90 (t, *J*=7.4 Hz, 3H, C-CH₂-CH₃); 1.98-2.10 (q, *J*=7.4 Hz, 2H, C-CH₂-CH₃); 2.81-2.83 (d, *J*=4.8 Hz, 3H, N-CH₃); 3.04-3.22 (m, 4H); 3.26-3.50 (m, 4H); 3.74 (s, 3H, O-CH₃); 4.36-4.42 (t, *J*=7.5 Hz, 1H, C14); 6.58-6.60 (d, *J*=2.7 Hz, 1H, C4); 6.77-6.81 (dd, *J*=2.7, 8.7 Hz, 1H, C2); 7.03-7.51 (m, 5H, arom. H); 12.58 (s, 1H, HCl). ¹³C, dept (63MHz, CDCl₃) δ 12.33 (C-CH₂-CH₃); 29.91; 30.92; 42.66 (N-CH₃); 45.19; 55.20 (O-CH₃); 56.64; 56.85; 113.03; 115.16; 126.63; 127.60; 127.77; 128.84; 129.93; 135.56 (quat.); 136.07 (quat.); 137.61 (quat.); 143.82 (quat.); 157.95 (quat.). Anal. calcd. for C₂₁H₂₈ClNO x 1/2 HCl: C 69.27%, H 7.89%, N 3.85%; found: C 69.40%, H 7.50%, N 3.62%.

6,8,9,14-Tetrahydro-5H-indolo[2',3':3,4]pyrido[2,1-a]isoquinolin-7-ium iodide (13)

Crystallized in ethanol. Yellow crystals, yield: 89%, MP.: 176 °C. ¹H (250MHz, DMSO) δ 3.21-3.27 (t, *J*=6.8 Hz, 2H); 3.33-3.39 (t, *J*=8.6 Hz, 2H); 4.07-4.12 (t, *J*=6.7 Hz, 2H); 4.2-4.3 (t, *J*=8.2 Hz, 2H); 7.20-7.26 (t, *J*=7.3 Hz, 1H, arom. H); 7.43-7.49 (t, *J*=7.6 Hz, 1H, arom. H); 7.58-7.62 (m, 3H, arom. H); 7.66-7.84 (m, 2H, arom. H); 8.08-8.12 (d, *J*=7.7 Hz, 1H, arom. H); 12.15 (s, 1H, NH). ¹³C, dept (63MHz, DMSO) δ 19.36; 26.40; 49.90; 51.76; 114.03; 121.92; 122.01; 124.46 (quat.); 124.69 (quat.); 125.06 (quat.); 125.24 (quat.); 128.53; 128.56; 129.00; 132.55; 135.71; 139.78 (quat.); 141.75 (quat.); 156.97 (quat.). Anal. calcd. for C₁₉H₁₇IN₂ x 1/2 CHCl₃: C 50.92%, H 3.84%, N 6.09%; found: C 50.77%, H 3.55%, N 5.98%.

14b-Methyl-5,6,8,9,14,14b-hexahydroindolo[2',3':3,4]pyrido[2,1-a]isoquinoline (14a)

Orange powder, yield: 37%, MP.: 117 °C. ¹H (250MHz, CDCl₃) δ 1.91 (s, 3H, C-CH₃); 2.69-2.84 (m, 2H); 2.95-3.29 (m, 4H); 3.71-3.82 (m, 2H); 7.06-7.37 (m, 6H, arom. H); 7.48-7.50 (d, *J*=6.9 Hz, 1H, arom. H); 7.64-7.67 (d, *J*=7.7 Hz, 1H, arom. H); 7.84 (s, 1H, NH). ¹³C, dept (63MHz, CDCl₃) δ 17.78; 28.82; 30.38 (C-CH₃); 45.45; 46.82; 58.19 (quat.); 105.81 (quat.); 110.83; 118.30; 119.45; 121.64; 125.81; 126.38; 126.62; 127.62 (quat.); 129.98; 134.48 (quat.); 135.64 (quat.); 137.43 (quat.); 139.95 (quat.). Anal. calcd. for C₂₀H₂₀N₂ x 2/7 CH₂Cl₂: C 77.93%, H 6.63%, N 8.96%; found: C 77.64%, H 6.87%, N 8.72%.

7,14b-Dimethyl-5,6,8,9,14,14b-hexahydroindolo[2',3':3,4]pyrido[2,1-a]isoquinolin-7-ium iodide (15a)

Yellow crystals, yield: 48%, MP.: 256 °C. ¹H (250MHz, Methanol-*d*₄) δ 2.17 (s, 3H, C-CH₃); 3.18-3.35 (m, 4H); 3.22 (s, 3H, N-CH₃); 3.84-4.05 (m, 3H); 4.21-4.41 (m, 1H); 7.01-7.13 (t, *J*=6.9 Hz, 1H,

arom. H); 7.21-7.26 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, arom. H); 7.27-7.32 (m, 3H, arom. H); 7.47-7.53 (m, 3H, arom. H). Anal. calcd. for $C_{21}H_{23}N_2$: C 58.33%, H 5.61%, N 6.33%; found: C 58.61%, H 5.39%, N 6.51%.

7,15-Dimethyl-6,7,8,9,14,15-hexahydro-5H-indolo[3,2-f][3]benzazecine (2a)

The crude product was dissolved in little chloroform and few drops of ethereal HCl were added. The HCl-salt precipitated and was recrystallized from little chloroform. White crystals, yield: 63%, MP.: 208 °C. 1H (250MHz, $CDCl_3$) δ 1.75-1.78 (d, $J=7.0$ Hz, 3H, C-CH₃); 2.77 (s, 3H, N-CH₃); 3.15-3.33 (m, 5H); 3.66-3.81 (m, 1H); 3.92-4.05 (m, 2H); 4.87-4.90 (q, $J=7.1$ Hz, 1H, C15); 7.00-7.19 (m, 4H); 7.26-7.41 (m, 3H); 7.71-7.74 (d, $J=7.2$ Hz, 1H); 8.16 (s, 1H, NH); 12.46 (s, 1H, HCl). ^{13}C , dept (100MHz, DMSO) δ 20.90; 20.96 (C-CH₃); 30.32; 32.00 (N-CH₃); 44.65 (C15); 54.89; 56.77; 107.44 (quat.); 111.47; 118.39; 119.04; 121.48; 127.00; 127.01 (quat.); 127.54; 127.95; 130.08; 136.15 (quat.); 136.62 (quat.); 139.51 (quat.); 142.51 (quat.). Anal. calcd. for $C_{21}H_{25}ClN_2 \times H_2O \times CHCl_3$: C 55.25%, H 5.90%, 5.86%; found: C 54.95%, H 6.21%, H 5.89%.

14b-Ethyl-5,6,8,9,14,14b-hexahydroindolo[2',3':3,4]pyrido[2,1-a]isoquinoline (14b)

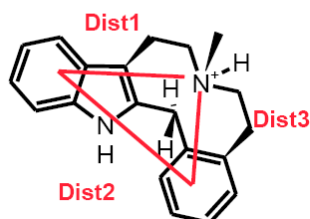
Purified by column chromatography using CH_2Cl_2 /methanol (75:2) as eluent. Yield 66%, Mp.: 109 °C. 1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ 0.73 - 0.79 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₃-CH₂), 2.26-2.34 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, CH₃-CH₂), 2.67 - 2.91, 2.94 - 3.21, 3.48 - 3.64 (mc, 8H, C5, C6, C8, C9), 7.05 - 7.35 (m, 6H, arom. H), 7.48 - 7.50 (d, $J=7.0$ Hz, 1H, arom. H), 7.57 - 7.60 (d, $J=8.1$ Hz, 1H, arom. H), 7.82 (s, 1H, NH). Anal. calcd. for $C_{21}H_{22}N_2 \times \frac{1}{5} CH_2Cl_2$: C 79.72%, H 7.07%, 8.77%; found: 79.80%, H 7.05%, H 8.55%.

15-Ethyl-7-methyl-6,7,8,9,14,15-hexahydro-5H-indolo[3,2-f][3]benzazecine (2b)

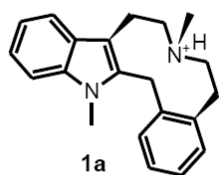
White waxy solid. Yield 66%, Mp.: 106 °C. 1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ 0.92-0.98 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH₃-CH₂), 2.04-2.21 (m, 2H, CH₃-CH₂), 3.22 (s, 3H, N-CH₃), 2.52-3.54 (m, 8H, C5, C6, C8, C9), 4.85-4.91 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, C15), 7.05 - 7.28 (m, 7H, arom. H), 7.43 - 7.46 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, arom. H). Anal. calcd. for $C_{22}H_{26}N_2 \times H_2O$: C 78.53%, H 8.39%, 8.33%; found: 78.76%, H 8.68%, H 8.11%.

In silico studies

The x-ray structure of LE300xHCl was obtained from the CCDC (no. CCDC-198889) as cif file and opened with DS visualize (Accelrys Discovery Studio Visualizer 2.5). One molecule was saved as mol2 file and opened with Sybyl-X 1.0, Created Aug 2009, Copyright 1991-2009, Tripos, L.P.. After adding the hydrogens and fixing the atom types, centroids were defined for the benzene and the indole moiety. The molecule was then minimized using Gasteiger Marsilli charges, 1000x. Then the three distances were measured.

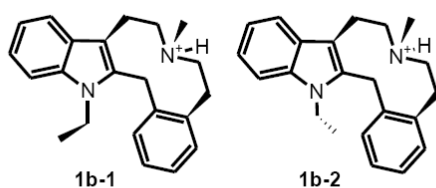


Calculations for compound 1a



Calculated for	Dist1 Å	Dist2 Å	Dist3 Å	E-total kcal/mol
LE300xray	4.914	5.746	5.120	69.283
min LE300xray	4.797	5.520	5.186	39.893
LE300xray + N-Methyl	4.914	5.746	5.120	77.915
min LE300xray+ N-Methyl min	4.693	5.570	5.223	43.724
LE300xray + N-Methyl min	4.695	5.570	5.224	43.724
+ N-Methyl average	4.694	5.570	5.224	
Difference between average and LE300xray min	-0.103	+0.050	+0.038	

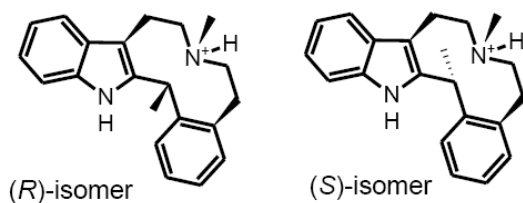
Calculations for compound 1b



compound	Calculated for	Dist1 Å	Dist2 Å	Dist3 Å	E-total kcal/mol
LE300	LE300xray	4.914	5.746	5.120	69.283
	min LE300xray	4.797	5.520	5.186	39.893
1b	LE300xray + N-Ethyl	4.914	5.746	5.120	Depends on sketching
1b-2	LE300xray + N-Ethyl min*	4.751	5.742	5.230	43.674
	minLE300xray+ N-Ethyl min*	4.746	5.755	5.230	43.671
	Average + N-Ethyl min*	4.749	5.749	5.230	
	Difference between average and min LE300xray	-0.048	+0.229	+0.044	
1b-1	LE300xray+ N-Ethyl min**	4.706	5.655	5.232	42.149
	minLE300xray+ N-Ethyl min**	4.708	5.655	5.232	42.149
	Average + N-Ethyl min**	4.707	5.655	5.232	
	Difference between average and min LE300xray	-0.090	+0.135	+0.046	
1b	+ N-Ethyl Average	4.727	5.702	5.231	
	Difference between average and min LE300xray	- 0.070	+ 0.182	+ 0.045	

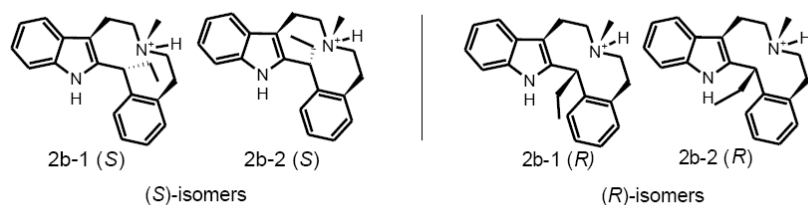
* ethyl straight back; **ethyl straight ahead

Calculations for compound 2a



compound	Calculated for	Dist1 Å	Dist2 Å	Dist3 Å	E-total kcal/mol
LE300	LE300xray	4.914	5.746	5.120	69.283
	min LE300xray	4.797	5.520	5.186	39.893
2a (R)	LE300xray + (R)-Methyl	4.914	5.746	5.120	Depends on sketching
	LE300xray + (R)-Methyl min	4.755	5.497	5.195	42.914
	min LE300xray + (R)-Methyl min	4.755	5.490	5.196	42.914
	+ (R)-Methyl average	4.755	5.4935	5.1955	
	Difference between average and min LE300xray	- 0.042	+ 0.0265	+ 0.0095	
2a (S)	LE300xray + (S)-Methyl min	4.601	5.530	5.253	48.252
	min LE300xray + (S)-Methyl min	4.604	5.542	5.251	48.253
	+ (S)-Methyl min average	4.6025	5.536	5.252	
	Difference between average and LE300xray min	-0.1945	+ 0.016	+ 0.066	

Calculations for compound 2b

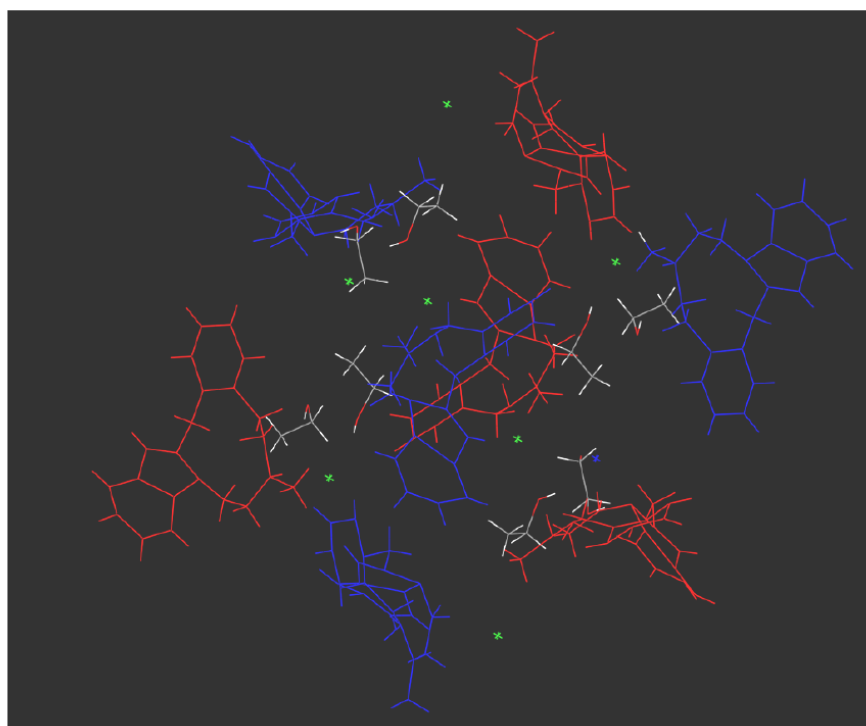
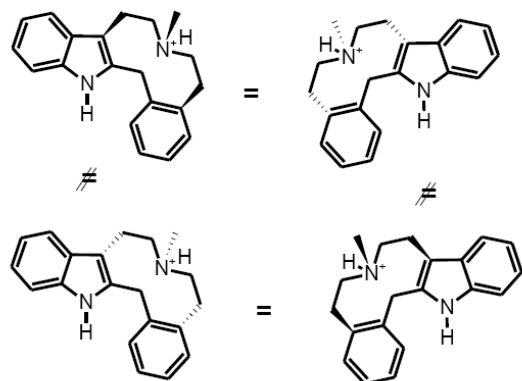


compound	Calculated for	Dist1 Å	Dist2 Å	Dist3 Å	E-total kcal/mol
LE300	LE300xray	4.914	5.746	5.120	69.283
LE300	min LE300xray	4.797	5.520	5.186	39.893
2b-2	LE300xray + Ethyl*	4.914	5.746	5.120	Depends on sketching
2b-2 (R)	LE300xray + Ethyl (R) min	4.745	5.476	5.198	42.807
	min LE300xray + Ethyl* (R) min	4.752	5.481	5.196	42.807
	Diff. 2b-2 (R) average / min LE300xray	- 0.0485	- 0.0415	+ 0.011	
2b-1 (R)	LE300xray + Ethyl** (R) min	4.820	5.588	5.163	43.363
	min LE300xray + Ethyl** (R) min	4.816	5.585	5.165	43.363
	Diff. 2b-1 (R) average/ min LE300xray	+ 0.021	+ 0.0665	-0.022	
2b (R)	2b-1 (R) und 2b-2 (R) average	4.78325	5.5325	5.1805	
	Difference between average and min LE300xray	-0.0137	+ 0.0125	-0.0055	
2b-1 (S)	LE300xray + Ethyl** (S) min	4.605	5.526	5.247	48.338
	min LE300xray + Ethyl** (S) min	4.616	5.536	5.245	48.340
	Diff. 2b-1 (S) average/ min LE300xray	- 0.1865	+ 0.011	+ 0.060	
2b-2 (S)	LE300xray + Ethyl* (S) min	4.620	5.555	5.247	48.345
	min LE300xray + Ethyl* (S) min	4.628	5.548	5.245	48.345
	Diff. 2b-2 (S) average / min LE300xray	- 0.173	+0.0315	+ 0.060	
2b (S)	2b-1 (S) und 2b-2 (S) min average(* and **)	4.61725	5.54125	5.246	
	Difference between average and min LE300xray	-0.1797	+0.02125	+ 0.060	
2b	2b total average	4.70025	5.53687	5.12325	
	Difference between total average and min LE300xray	-0.09675	+0.01687	-0.06275	

* ethyl points towards indole; ** ethyl points towards benzene

Crystal structure of LE300xHCl

Special chirality of hexahydrodibenzo[*d,g*]azecines shown by different colours



References

1. Decker, M. and Lehmann, J. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2003**, 336, 466.
2. Cheng, Y. and Prusoff, W. H. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, 22, 3099.
3. Hoefgen, B.; Decker, M.; Mohr, P.; Schramm, A. M.; Rostom, S. A.; El Subbagh, H.; Schweikert, P. M.; Rudolf, D. R.; Kassack, M. U.; and Lehmann, J., *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 760.
4. Kassack, M. U.; Hofgen, B.; Lehmann, J.; Eckstein, N.; Quillan, J. M.; and Sadee, W. *J. Biomol. Screen.* **2002**, 7, 233.
5. Enzensperger, C., Lehmann, J. *J. Med. Chem.* **2006**, 49 (21): 6408.

3 Bisher unveröffentlichte Ergebnisse

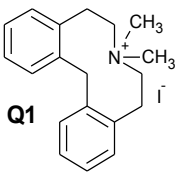
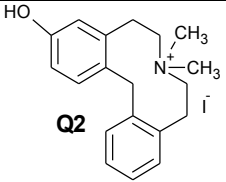
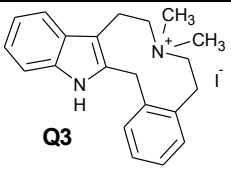
Im Folgenden werden Ergebnisse erläutert, welche in den vorgestellten Publikationen aus Kapitel 2 nicht enthalten sind. Die zur Charakterisierung notwendigen analytischen Daten der neuen Verbindungen sind in Kapitel 8.1 zusammengestellt.

3.1 Quartäre Ammonium-Verbindungen als Dopamin-Rezeptor-Liganden

Bisher wurden quartäre Ammonium-Verbindungen nicht in die Suche nach affinen Liganden für Dopamin-/Serotonin-Rezeptoren eingeschlossen, da die Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit aufgrund der geringen Lipophilie sehr unwahrscheinlich ist. Allerdings besitzen alle hochaffinen Dopamin-Rezeptor-Liganden basische Stickstoffatome, die am Rezeptor in protonierter Form binden könnten. So zeigten *Andujar et al.* (2008) anhand von Antagonisten und Agonisten durch *in silico*-Studien eine Salzbindung zwischen dem Stickstoffatom und dem Aspartat D3.32 in der Transmembranregion 3 des Rezeptors. *Torrice et al.* (2009) hingegen postulierten eine Kation- π -Wechselwirkung mit dem Tryptophan W6.48. Um zu untersuchen, ob eine solche Kationen-Rezeptor-Interaktion für die Affinitäten der *[d,g]*-Azecine an Dopamin-Rezeptoren entscheidend ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Verbindungen synthetisiert, die eine permanente Ladung am Stickstoff tragen. Zum einen handelt es sich um *[d,g]*-Azecine, welche eine zweite Methylgruppe am Stickstoff besitzen (im Folgenden kurz als Azecinium-Derivate bezeichnet **Q1–Q3**) und zum anderen um *N*-methylierte Tetrahydrodibenzochinolizine (Chinolizinium-Derivate, **Q4–Q10**) bzw. deren ringerweiterte Homologe (**Q11–Q13**). Sämtliche Verbindungen wurden mittels Methyljodid in Acetonitril synthetisiert und zeigten im NMR-Spektrum ein Singulett der *N*-Methyl-Gruppe(n) zwischen 2,5 ppm und 3,5 ppm. Sowohl die Azecinium-Verbindungen als auch die ringerweiterten Chinolizinium-Homologen stellen bisher in der Literatur nicht beschriebene Verbindungstypen dar.

In Radioligand-Bindungsexperimenten zeigten die Azecinium-Verbindungen (**Q1–Q3**) leichte Affinitäten zu D₁-Rezeptoren und zum Teil auch schwache Affinitäten zu D₂-, D₄- und D₅-Rezeptoren. Hingegen trat am D₃-Rezeptor bei keiner der Verbindungen eine messbare Affinität bis zu einer Konzentration von 10 μ M auf (Tabelle 3.1.1).

Tabelle 3.1.1 Azecinium-Salze und ihre Affinitäten zu humanen geklonten Dopamin-Rezeptoren

Substanz	K_i [nM] \pm SEM				
	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅
 Q1	5.620 [*]	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000
 Q2	859 \pm 23	>10.000	>10.000	1.095 \pm 59	314 \pm 81
 Q3	2.997 \pm 1980	706 \pm 33	>10.000	>10.000	2.696 \pm 252

^{*}nur ein Messwert im Radioligand-Bindungsassay

Bei allen untersuchten [d,g]-annelierten Tetrahydrodibenzochinolizinium-Salzen (**Q4-Q8**) konnten analog zu ihren Tetrahydrodibenzo[d,g]chinolizin-Vorstufen keine Affinitäten zu Dopamin-Rezeptoren bis zu einer Konzentration von 10 μ M festgestellt werden (Abbildung 3.1.1).

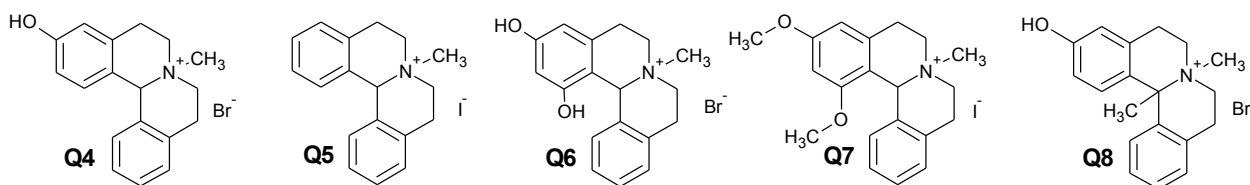


Abbildung 3.1.1 Untersuchte Tetrahydrodibenzo[d,g]chinolizinium-Salze

Es liegt daher die Vermutung nahe, dass die durch Öffnung der C-N-Bindung hervorgerufene gesteigerte Flexibilität der 10- und 11-Ring-Derivate zur Bindung am Rezeptor beiträgt, während die tetrazyklischen Derivate zu starr sind. Dieser Ansatz wurde ausgiebig in **Publikation 1** diskutiert.

Die meisten [c,g]-Chinoliziniumsalze (Abbildung 3.1.2, **Q9, Q10**) und ihre ringerweiterten Homologe (**Q11-Q13**) zeigten bis zu einer Konzentration von 10 μ M ebenfalls keine messbaren Affinitäten an Dopamin-Rezeptoren.

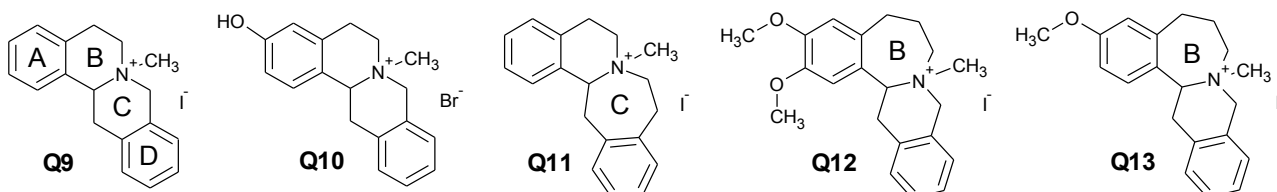


Abbildung 3.1.2 Tetrahydrodibenzo[c,g]chinolizinium-Salze und Ring-erweiterte Homologe

Ausschließlich das 3-Methoxy-substituierte [c,g]-Chinolizinium-Salz (**Q14**) und sein C-Ring-erweitertes Homolog (**Q15**) zeigten schwache antagonistische Eigenschaften am D₁-Rezeptor (Abbildung 3.1.3). An D₂-D₅-Rezeptoren waren auch diese Verbindungen nicht aktiv. Damit verhielten sich die Methoxy-substituierten quartären Ammoniumverbindungen analog den zugrundeliegenden Derivaten mit tertiärem Stickstoff. Dort zeigte das B-Ring-erweiterte Homolog ebenfalls keine Affinitäten zu Dopamin-Rezeptoren bis zu einer Konzentration von 10 µM, während die C-Ringerweiterung zu affinen Liganden führte (vgl. **Publikation 2**).



Abbildung 3.1.3 Strukturen und D₁-Affinitäten von 3-Methoxy-7-methyl-5,8,13,13a-tetrahydro-6H-isochino[3,2-a]isocholinoliniumiodid (**Q14**) und 3-Methoxy-7-methyl-5,6,8,9,14,14a-hexahydroisochino[1,2-b][3]benzazepiniumiodid (**Q15**)

Eine Quartärnisierung des Stickstoffatoms scheint sich grundsätzlich negativ auf die Bindungsaffinitäten an Dopamin-Rezeptoren auszuwirken. Alle tertiären Verbindungen mit messbaren Affinitäten zu Dopamin-Rezeptoren blockierten die Rezeptoren in geringeren Konzentrationen als die entsprechenden Substanzen mit quartärer Ammoniumsalz-Struktur. Durch *in silico*-Vermessungen an energieminimierter Strukturen konnte ausgeschlossen werden, dass die Ergebnisse auf einer veränderten Konformation des Gesamtmoleküls durch die zusätzliche Methylierung beruhen (zur Methode siehe **Publikation 2**).

3.2 Versuche zur Synthese von 3-Methoxy-5,6,7,8,9,14-hexahydro-dibenzo[d,g]azecin als Edukt für die *ad-hoc* Synthese eines ¹¹C-Radioliganden

Isotopenmarkiertes 7-Methyl-3-Methoxy-5,6,7,8,9,14-Hexahydrodibenzo[d,g]azecin sollte in der Arbeitsgruppe von Coenen (Institut für Nuklearchemie, Jülich) als Radioligand für die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) eingesetzt werden. PET ist ein bildgebendes Verfahren der Nuklearmedizin. Die dabei verwendeten PET-Liganden werden unter anderem genutzt, um die Verteilung von Rezeptoren im Körper sichtbar zu machen, da sie sich pharmakologisch genauso verhalten wie die nicht-markierten Substanzen. Die für diese Technik notwendigen Radioisotope wie ¹¹C oder ¹⁸F besitzen nur sehr geringe Halbwertszeiten (20 bzw. 110 min), weshalb sie zumeist im letzten Reaktionsschritt in die Verbindung eingefügt werden. Es ist daher notwendig, eine Vorstufe des eigentlichen Liganden zu synthetisieren, welche durch einen einzigen Reaktionsschritt mit leicht zugänglichen isotopenmarkierten Molekülen zum Endprodukt reagieren kann. Zu

diesem Zweck sollte das *NH*-Derivat **N1** synthetisiert werden, um es später direkt vor der PET-Untersuchung mit [^{11}C]-Methyliodid in den eigentlichen Liganden umzuwandeln (Abbildung 3.2.1).

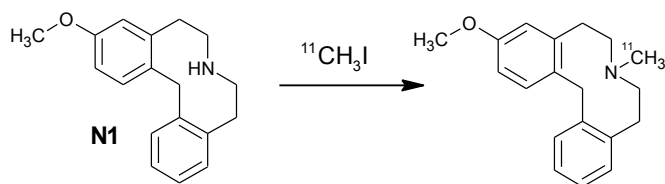


Abbildung 3.2.1 Letzer Syntheseschritt bei der Darstellung eines Radioliganden aus 3-Methoxy-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo[d,g]azecin

In früheren Arbeiten wurde bereits eine ähnliche Verbindung für PET-Studien synthetisiert, welche statt der Methoxy- eine Hydroxysubstitution aufwies (Enzensperger 2007b). Zunächst wurde versucht eine ähnliche Synthesestrategie anzuwenden und die zentrale C-N-Bindung von Verbindung **N2** mit Chlorameisensäureethylester und Natriumcyanoborhydrid zu spalten. Dies gelang mit einer Ausbeute von 96% (Abbildung 3.2.2), wobei die dargestellte Zwischenstufe nicht aufgereinigt und charakterisiert wurde. Da die Methoxyfunktion erhalten bleiben sollte, konnte eine Reduktion mit BBr_3 , wie in der oben erwähnten Publikation, nicht für die folgende reduktive Urethanspaltung herangezogen werden. Es wurden daher vier weitere Synthesewege angewendet, die sämtlich für eine selektive Spaltung von Urethanen beschrieben sind und die Methoxygruppe nicht angreifen sollten (Abbildung 3.2.2, a-d).

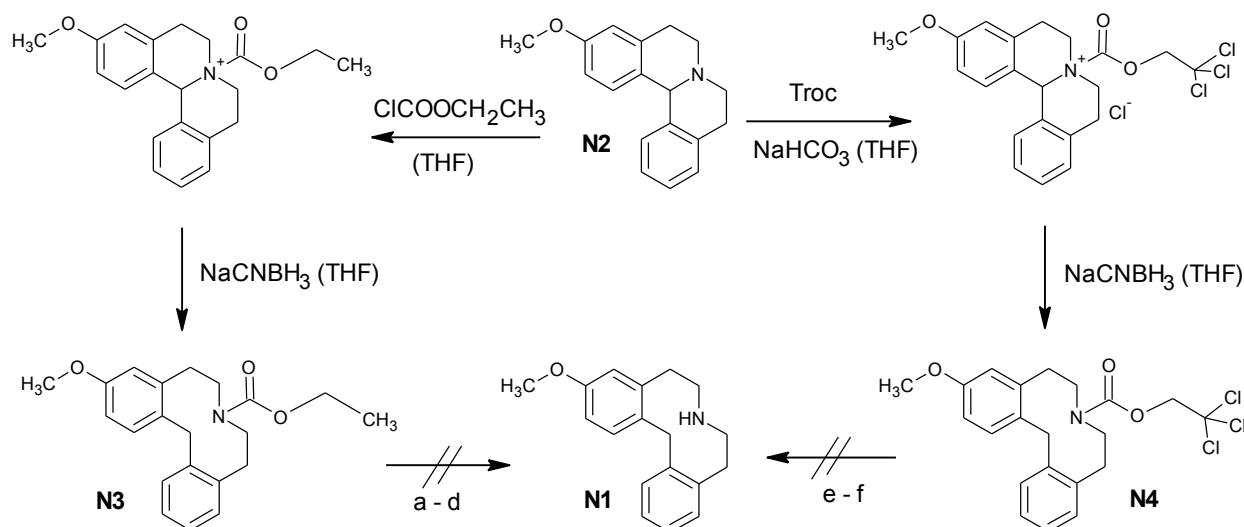


Abbildung 3.2.2 Syntheseversuche der *NH*-Verbindung

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) KOH, *i*-Propanol; b) NaOH, TEBA; c) KOH, Ethylenglykol; d) KOH, Ethylenglykol, Hydrazin; e) Zn, Methanol; f) H_2 , Pd/C

Zunächst wurde versucht, das Urethan **N3** durch Erhitzen mit starken Basen zu spalten. Im Gegensatz zum sauren Milieu bleibt hierbei die Methoxygruppe stabil. Es wurde eine Vorschrift von *Benedetti-Doctorovich et al.* (1995) verwendet, nach welcher das Urethan mit 10%iger Kaliumhydroxidlösung in gesättigtem Isopropanol 24 h unter Stickstoffatmosphäre refluxiert werden sollte (a). Nach Aufreinigung durch Ausschütteln mit Wasser/Diethylether wurde das entstandene farblose Öl durch GC-MS-Analyse als Edukt ($M=339$ g/mol) identifiziert.

Ebenso ergab das 28-stündige Erhitzen mit 10%iger methanolischer Natriumhydroxid-Lösung unter Zusatz von TEBA als Phasentransferkatalysator (b), bzw. das 48-stündige Erhitzen mit Kaliumhydroxid in Ethylenglykol (c) ausschließlich das Edukt. Durch GC-MS-Analyse und NMR-Spektroskopie wurde dieses in 98%iger Reinheit nachgewiesen.

Als weitere Spaltungsmöglichkeit wurde ein Verfahren genutzt, welches von *Shono et al.* (1984) beschrieben worden ist und der *Wolff-Kishner*-Reaktion ähnelt. Das Urethan wurde zunächst in Ethylenglykol gelöst und nach Zugabe von Kaliumhydroxid und Hydrazin für 1,5 h refluxiert (d). In der DC-Kontrolle und durch GC-MS-Analyse konnte jedoch erneut keine Umsetzung des Ausgangsstoffes festgestellt werden.

Versuche mit Boc- und Troc-Schutzgruppen verliefen ebenfalls erfolglos. Die Umsetzung des Tetrahydrodibenzochinolizins in THF mit Triethylamin und Boc-Anhydrid und anschließender Abspaltung der Boc-Gruppe mit Trifluoressigsäure führte zu keinem auswertbaren Ergebnis (Abbildung 3.2.3).

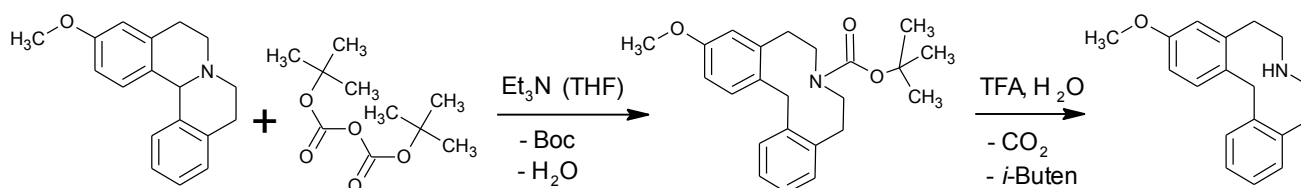


Abbildung 3.2.3 Syntheseversuch der *NH*-Verbindung mit Boc als Schutzgruppe

Mit Troc konnte zwar die Spaltung der *C-N*-Bindung zum 10-Ring-Derivat **N4** analog der für den Chlorameisensäureethylester beschriebenen Synthese erfolgreich durchgeführt werden (Ausbeute 25%), allerdings verliefen die Spaltungen zur *NH*-Verbindung **N1** ohne Erfolg (Abbildung 3.2.2, e-f). Hierbei wurde versucht, die Troc-Gruppe über eine reduktive Spaltung durch Zink in heißem Methanol (e) bzw. durch Hydrierung mittels H_2 , Pd/C (f) zu entfernen.

Da bei den meisten Spaltungsversuchen das Edukt (insbesondere **N3**) erhalten blieb, sollten bei künftigen Versuchen drastischere Wege zur Spaltung des Urethans herangezogen werden. Es ist allerdings zu überdenken, inwiefern dieser Radioligand bei PET-Screenings überhaupt von Vorteil wäre. Zwar umgeht man die hinsichtlich der Bioverfügbarkeit ungünstige phenolische OH-Gruppe des erwähnten 3-Hydroxyderivats (vgl. 4.3.2), allerdings ist das 7-Methyl-3-methoxyhexahydrodibenzo[*d,g*]azecin wenig selektiv für einzelne Dopamin-Rezeptor-Subtypen.

3.3 Versuche zur Synthese eines an Dopamin-Rezeptoren agonistisch wirkenden Hexahydrodibenzo[*d,g*]azecins

Die bisher synthetisierten aromatisch annelierten [*d,g*]-Azecine zeigen ausschließlich antagonistische Aktivitäten an allen Dopamin-Rezeptoren (zur Methode des funktionellen Calciumassays siehe **Publikation 1**). Bisher ist nicht bekannt, warum dies so ist und ob die Möglichkeit besteht, die Funktionalität der [*d,g*]-Azecine durch Variation des Substitutionsmusters zu verändern. Im Falle der Tetrahydrodibenzo[*c,g*]chinolizine wurde die Bedeutung des Substitutionsmusters auf die Funktionalität in Rahmen dieser Arbeit gezeigt (vgl. **Publikation 1**). Im Folgenden sind zwei Ansätze beschrieben, ein Hexahydrodibenzo[*d,g*]azecin mit agonistischen Eigenschaften zu entwerfen.

Aktive Verbindungen an Dopamin-Rezeptoren, die analog des intrinsischen Liganden Dopamin zwei Hydroxygruppe in ortho-Stellung am Aromaten aufweisen, zeigen häufig, wie beispielsweise Apomorphin oder Dihyrexidin, agonistische Eigenschaften (Zhang 2007b). Es konnte bereits gezeigt werden, dass bei [*d,g*]-Azecinen phenolische OH-Gruppen am C1 und/oder C3 nicht zu agonistischen Eigenschaften führen (vgl. **Publikation 5**, (Hoefgen 2006)). Dies deutet darauf hin, dass insbesondere die Substitution am C2 entscheidend für die Funktionalität am Rezeptor sein könnte. Es wurde daher versucht, ein Tetrahydrodibenzo[*d,g*]azecin zu synthetisieren, welches eine entsprechende OH-Substitution am C2 besitzt (Abbildung 3.3.1).

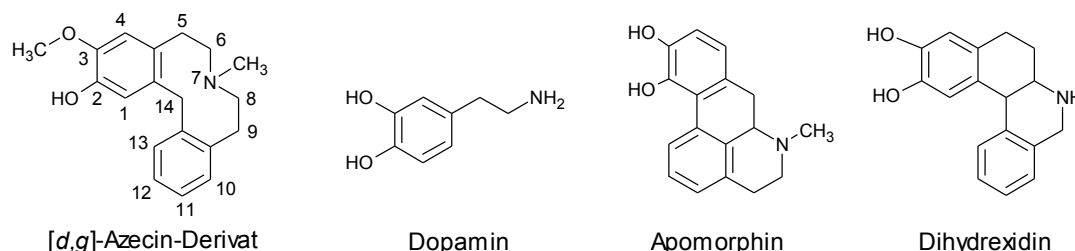


Abbildung 3.3.1 Dopamin-Agonisten und das geplante 3-Methoxy-7-methyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo-*[d,g]*azecin-2-ol

Da benachbarte Hydroxygruppen am Aromaten sehr oxidationsanfällig sind, wurde versucht ein 2-Hydroxy-3-methoxy-Derivat ausgehend von Vanillin zu synthetisieren (Abbildung 3.3.2). Dieses könnte anschließend über eine Etherspaltung in das 2,3-Dihydroxy-Derivat überführt werden.

Die freie Hydroxygruppe des Vanillins wurde zunächst durch Umsetzung mit Benzylbromid in DMF geschützt. Anschließend konnte durch eine *Henry*-Kondensation mit Nitromethan und Reduktion mit LiAlH_4 das entsprechende Amin (**A3**) erhalten werden. Leider verlief die anschließende Umsetzung mit Isochromanon wenig erfolgreich, so dass der Ringschluss zum Tetrahydrodibenzo[*c,g*]chinolizin und die anschließende Spaltung der C-N-Bindung unter *Birch*-Bedingungen nicht möglich waren.

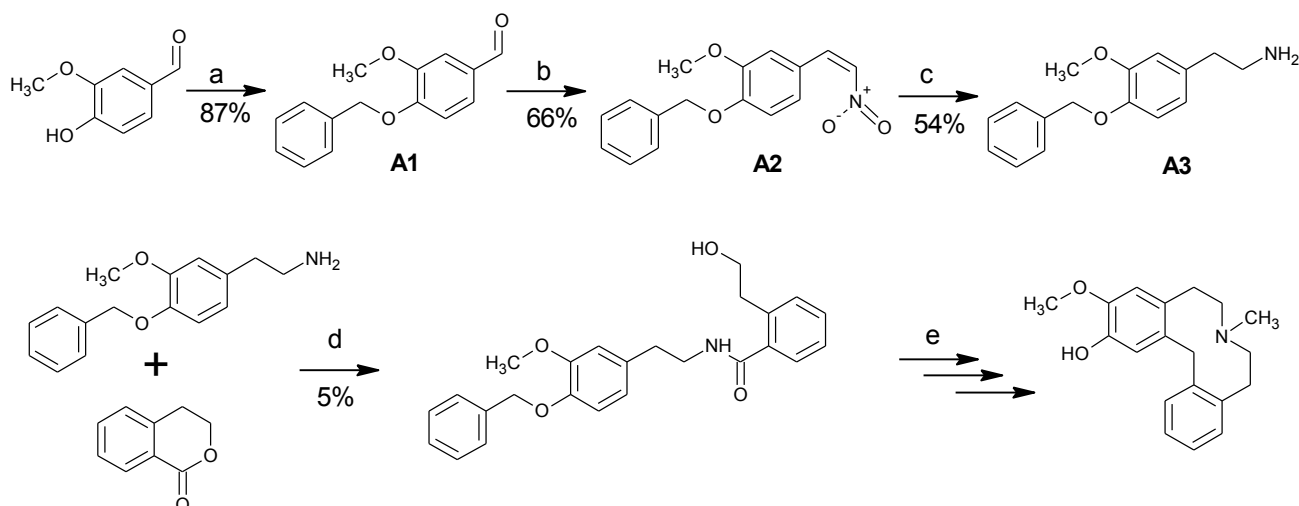


Abbildung 3.3.2 Synthesestrategie für 3-Methoxy-7-methyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo[d,g]azecin

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) K_2CO_3 , Benzylbromid, DMF, 25°C , 0,5h; b) CH_3NO_2 , BuNH_2 , Essigsäure, 100°C , 2,5h; c) LiAlH_4 , H_2SO_4 , THF, $0^\circ\text{C} \rightarrow 65^\circ\text{C}$, 1h; d) Toluol, 110°C , 4d; e) i: POCl_3 , Acetonitril, 95°C , 18h; ii: NaBH_4 , Methanol, $0-60^\circ\text{C}$, 6h; iii: CH_3I , Acetonitril, 25°C , 24h; iv: Na , NH_3^{liq} , -40°C , 15min.

Beim Vergleich der Strukturen bekannter Dopamin-Agonisten ist auffällig, dass es zahlreiche Beispiele für Dopamin-Agonisten gibt, die eine oder sogar mehrere Propylreste am Stickstoff tragen (Abbildung 3.3.3). Es wurde daher ein Hexahydrodibenzo[d,g]azecin synthetisiert, welches ebenfalls am Stickstoff eine Propylgruppe anstelle der sonst bevorzugten Methylgruppe trägt.

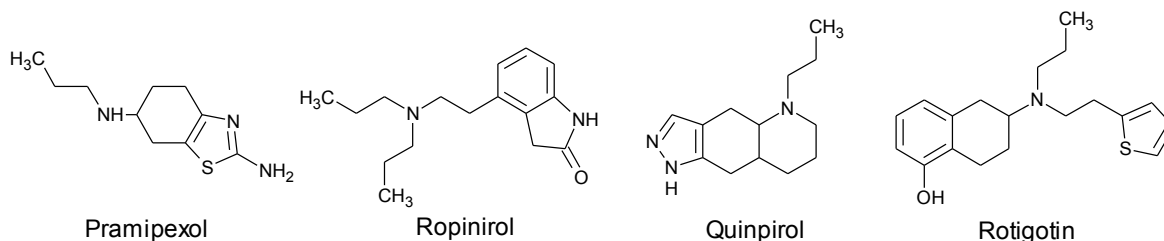


Abbildung 3.3.3 Beispiele einiger Dopamin-Agonisten mit Propylkette am Stickstoff

Die Verbindung 3-Methoxy-7-propyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo[d,g]azecin (**A5**) konnte ausgehend vom Tetrahydrodibenzochinolizin **N2** mit sehr guten Ausbeuten in zwei Stufen synthetisiert werden (Abbildung 3.3.4). Die Alkylierung erfolgte mittels 1-Iodpropan in Acetonitril. Das resultierende Tetrahydrodibenzochinolizinium-Salz (**A4**) wurde anschließend durch eine Birch-Reduktion mit Natrium in flüssigem Ammoniak in das entsprechende [d,g]-Azecin **A5** überführt.

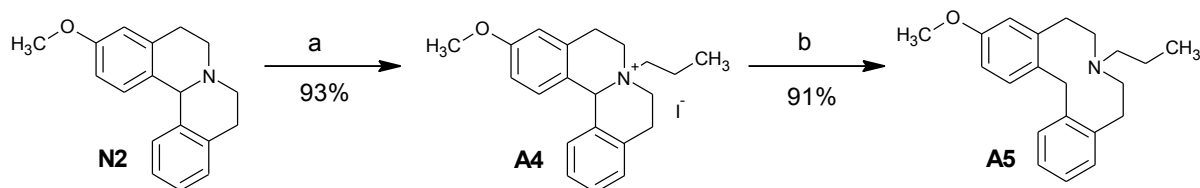


Abbildung 3.3.4 Synthese von 3-Methoxy-7-propyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo[d,g]azecin

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) 1-Iodpropan, Acetonitril, 25°C , 12h; b) Na , NH_3^{liq} , -40°C , 15min

Allerdings war auch dieses $[d,g]$ -Azecin als Agonist inaktiv im funktionellen Calciumassay. Als Antagonist zeigte die Verbindung **A5** außer an D_2 -Rezeptoren nur moderate Affinitäten zu den Dopamin-Rezeptoren (K_i [nM]: D_1 : 138; D_2 : 14 ± 1 ; D_3 : 410 ± 10 ; D_4 : 1652 ± 431 ; D_5 : 157 ± 50). Eine derartige D_2 -Selektivität konnte bisher bei Hexahydrodibenzo $[d,g]$ azecinen noch nicht beobachtet werden.

3.4 Bivalente Hexahydrodibenzo $[d,g]$ azecine

Der *Bivalent Ligand Approach* zur Affinitätssteigerung an Dopamin-Rezeptoren wurde bereits an Hexahydrobenzindolo $[d,g]$ azecinen und Hexahydrodibenzo $[d,g]$ azecinen durch Verknüpfung zweier $[d,g]$ -Azecine über die Azecin-Stickstoffatome durchgeführt (Abadi 2002; Decker 2007). Eine neue Variante war nun die Verknüpfung zweier Hexahydrodibenzo $[d,g]$ azecine über phenolische Hydroxygruppen (Abbildung 3.4.1). Diese bivalenten $[d,g]$ -Azecine wurden auf zwei Wegen dargestellt. Zum einen konnte über bivalente Tetrahydrodibenzochinolizine mittels Quartärnisierung und *Birch*-Reduktion, wie in **Publikation 4** beschrieben, das entsprechende bivalente $[d,g]$ -Azecin-Derivat erhalten werden. Andererseits war auch eine *Williamsonsche* Ether-synthese ausgehend von 5,6,7,8,9,14-Hexahydrodibenzo $[d,g]$ azecin-3-ol mit entsprechenden Dibromalkanen erfolgreich, nachdem mit äquimolaren Mengen Natriumhydrid in trockenem DMF eine Deprotonierung der phenolischen OH-Gruppe durchgeführt wurde. Die Reaktionsprodukte konnten im NMR-Spektrum an einem Triplett ($O-CH_2-CH_2R$) und Quartett ($O-CH_2-CH_2R$) sowie einem weiteren Multiplett bei Kettenlängen größer $n = 4$ identifiziert werden.

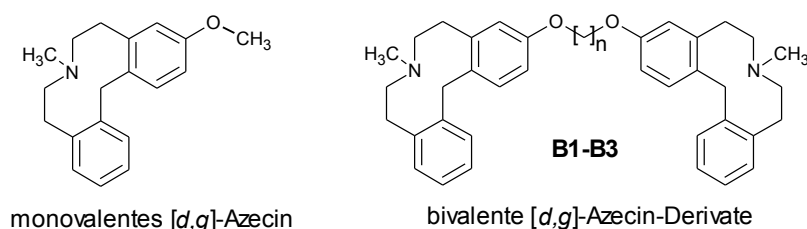


Abbildung 3.4.1 Mono- und bivalente $[d,g]$ -Azecine ($n = 3, 4, 6$)

Neben den in **Publikation 4** beschriebenen inhibitorischen Eigenschaften an Cholinesterasen, wurden für $n = 3, 4$ und 6 auch die Affinitäten und Funktionalitäten an Dopamin-Rezeptoren und die Zytotoxizität in einem MTT-Test an humanen Gliazellen bestimmt. Letzteres erschien insbesondere für mögliche *in vivo*-Versuche mit diesen Verbindungen wichtig, um zytotoxische Effekte durch die Substanzen im Tier auszuschließen.

Alle bivalenten Verbindungen zeigten antagonistische Eigenschaften an Dopamin-Rezeptoren und eine gesteigerte Zytotoxizität im Vergleich zur monomeren Verbindung. Sowohl die Affinitäten im Radioligandbindungsassay, als auch die Zytotoxizität waren kettenlängenabhängig. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.4.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.4.1 Ergebnisse der Radioligandbindungsstudien und des Zytotoxizitätsassays

Substanz	K_i [nM] \pm SEM					CC ₅₀ [μ M] Glia Zellen
	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅	
Monomer	23,4 \pm 5,2	13,0 \pm 9,0	75,7 \pm 7,3	43,4 \pm 13,3	54 \pm 20,5	390,3 \pm 3,3
B1 (n = 3)	0,9 \pm 0,4	11,8 \pm 1,3	16,5 \pm 0,8	4,3 \pm 0,02	2,0 \pm 1,4	26,5 \pm 0,7
B2 (n = 4)	64 \pm 27	95 \pm 27	285 \pm 147	356 \pm 58	55 \pm 22	8,2 \pm 0,9
B3 (n = 6)	390 \pm 39	650 \pm 148	5.382 \pm 695	>10.000	444 \pm 117	45,1 \pm 8,5

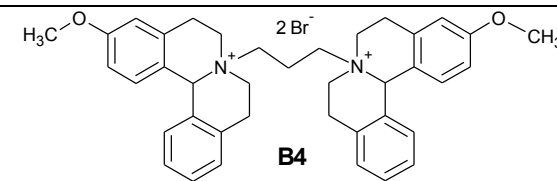
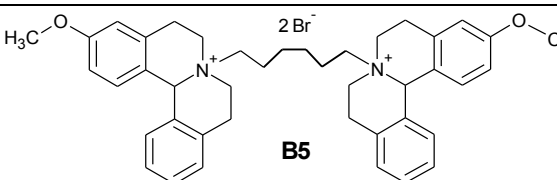
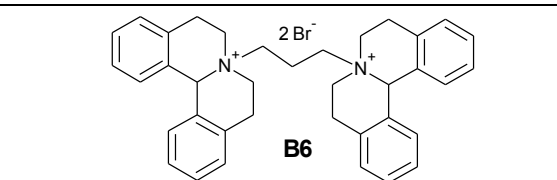
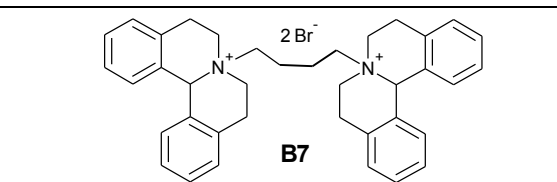
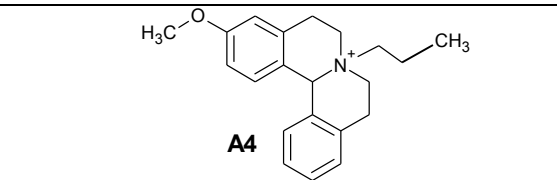
An allen Dopamin-Rezeptoren außer am D₂-Rezeptor zeigte die Verbindung **B1** mit einer Spacerlänge von n = 3 eine deutlich höhere Affinität als das monomere Azecin. Sowohl die monomere Verbindung als auch das propylenverknüpfte Bivalente **B1** hatten eine mindestens um den Faktor 1.500 geringere Toxizität als Affinität zu Dopamin-Rezeptoren. Die beiden bivalenten Verbindungen mit längeren Spacern (**B2**, **B3**) zeigten deutlich schlechtere Affinitäten an Dopamin-Rezeptoren als die monomere Struktur. Mit zunehmender Kettenlänge (bis n = 6) nimmt die Affinität an allen Dopamin-Rezeptoren ab. Eine solche lineare Beziehung konnte für die Toxizität an menschlichen Glia- und neuronalen Zellen nicht beobachtet werden. Das bivalente [d,g]-Azecin **B2** mit einer Kettenlänge von n = 4 zeigte die höchste Toxizität in dem durchgeführten MTT-Test (zur Methode siehe **Publikation 3**).

3.5 Inhibierung von Cholinesterasen durch bivalente N-verknüpfte Tetrahydrodibenzochinolizin-Derivate

Cholinesterase-Inhibitoren spielen, wie in Kapitel 1.3 erläutert, auch eine zunehmende Rolle bei der medikamentösen Behandlung der Schizophrenie. Neben den in **Publikation 4** vorgestellten, über den Sauerstoff verknüpften homobivalenten Verbindungen, wurden auch N-überbrückte bivalente Tetrahydrodibenzochinolizinium-Verbindungen (**B4-B7**) auf AChE- und BChE-Inhibition getestet.

Aus Tabelle 3.5.1 ist ersichtlich, dass die Verbindung **B5** mit einer Kettenlänge von n = 6 deutlich höhere inhibitorische Aktivitäten an der AChE aufwies, als die Derivate mit kürzeren Spacern, während eine kettenlängenabhängige Veränderung der inhibitorischen Aktivitäten an der BChE nicht zu beobachten war. Zudem scheint das zweite Pharmakophor für die AChE-Inhibition erst ab einer Kettenlängen von n = 6 eine Rolle zu spielen, da Verbindung **A4** ähnliche inhibitorische Aktivitäten an der AChE aufweist wie die bivalenten Derivate **B4**, **B6** und **B7**. Dies könnte auf eine Interaktion mit der zweiten Bindungsstelle der AChE hinweisen, wie es bei bivalenten Verbindungen mit vergleichbaren Kettenlängen bereits in der Literatur beschrieben ist (Du 2004).

Tabelle 3.5.1 Inhibitorische Aktivitäten an AChE und BChE sowie die BChE-Selektivität

Substanz	n	EC ₅₀ AChE [μM] (log EC ₅₀ ± SEM)	EC ₅₀ BChE [μM] (log EC ₅₀ ± SEM)	EC ₅₀ BChE/ EC ₅₀ AChE
 B4	3	6,9 (5,163 ± 0,067)	0,06 (7,220 ± 0,035)	0,003
 B5	6	0,8 (6,107 ± 0,022)	1,3 (5,869 ± 0,067)	1,63
 B6	3	23,2 (4,635 ± 0,133)	6,1 (5,213 ± 0,084)	0,20
 B7	4	15,6 (4,806 ± 0,135)	2,7 (5,558 ± 0,102)	0,06
 A4	3	29,4 (4,531 ± 0,064)	>100	--

Die erstaunlich hohe inhibitorische Aktivität des propylenverknüpften bivalenten 3-Methoxy-Derivats (**B4**) und die daraus resultierende hohe BChE-Selektivität kann aus den vorliegenden Ergebnissen nicht erklärt werden. Dennoch scheint eine Verknüpfung der beiden Monomere über die Stickstoffatome im Vergleich zur Überbrückung über die phenolischen Sauerstoffatome weniger günstig für die inhibitorische Aktivität zu sein (vgl. **Publikation 4**).

3.6 Tierversuche mit bivalenten Verbindungen

Aufgrund des großen Molekulargewichtes sollte die Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit von bivalenten Verbindungen eher gering sein (Pajouhesh 2005). Dennoch ist dies kein absolutes Kriterium, wie *in vivo*-Experimente mit einigen bivalenten Verbindungen bereits gezeigt haben (Decker 2007; Fang 2008).

In dieser Arbeit wurden zwei bivalente Verbindungen (Abbildung 3.6.1) *in vivo* auf ZNS-Wirkungen getestet. Zum einen handelte es sich um ein bivalentes Hexahydrodibenzo[*d,g*]azecin (**B1**) als potenzielles Neuroleptikum (vgl. Kapitel 3.4) und zum anderen um ein möglicherweise Kognition förderndes pentylenverknüpftes bivalentes Tetrahydrodibenzochinolizin (**B8**, vgl. **Publikation 4**).

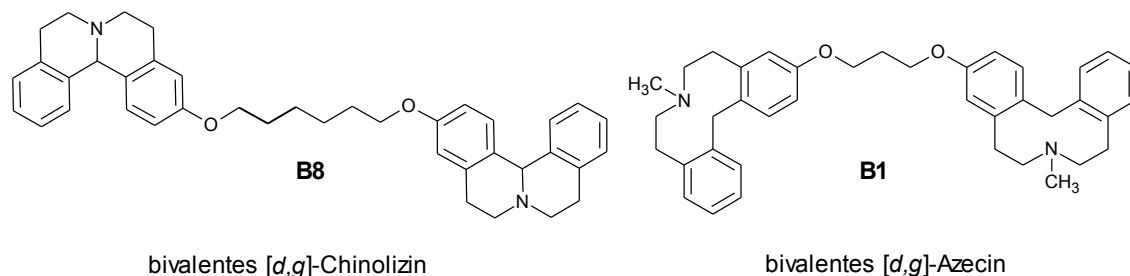


Abbildung 3.6.1 Bivalente Substanzen, welche in *in vivo*-Versuchen getestet wurden

Beide Verbindungen wurden im *Open Field*-Test untersucht (zur Methode siehe **Publikation 3**; Kapitel 1.4.3). Das Tetrahydrodibenzochinolizin-Derivat **B8** zeigte eine dosisabhängige signifikante Abnahme von horizontalen und vertikalen Bewegungen und nur geringfügige Veränderungen im Putz- und Kotverhalten der Tiere (Abbildung 3.6.2). Für die Hemmung der lokomotorischen Aktivität (vertikale + horizontale Bewegungen) wurde 30 Minuten nach intraperitonealer Substanzgabe eine ED_{50} von 0,56 mg/kg Körpergewicht erhalten.

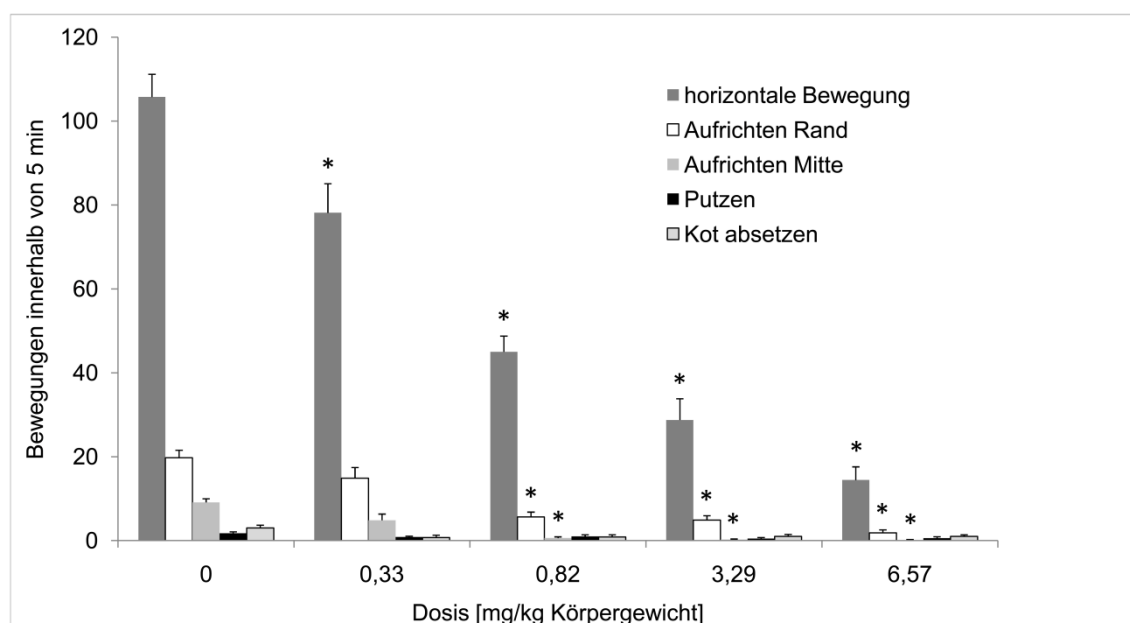


Abbildung 3.6.2 Ergebnisse des *Open Field*-Tests mit Verbindung B8

Mittelwert + SEM, 30 min nach Substanzgabe, 8 Ratten je Dosis, *-signifikante Veränderung zur Kontrolle ($p < 0,05$)

Als potenziell Kognition-verbessernde Substanz sollte Verbindung **B8** auch in einem *Radial Maze*-Experiment getestet werden. Hierbei wird Ratten vor Applikation der Testsubstanz, der Acetylcholin-Rezeptorblocker Scopolamin verabreicht. Dies führt dazu, dass sich die Tiere in einem Labyrinth, in welchem Nahrung versteckt ist, weniger gut zurechtfinden. Dadurch wird sowohl die Zeit bis zum Auffinden der Nahrung verlängert als auch die Anzahl mehrfach benutzter Wege

gesteigert. Cholinesterase-Inhibitoren können diesen Effekt von Scopolamin durch Anhebung des Acetylcholinspiegels teilweise oder ganz aufheben. Leider war es durch die deutlich reduzierte lokomotorische Aktivität nach Applikation von **B8** nicht möglich, aussagekräftige Werte in diesem Experiment zu ermitteln. Die *in vivo*-Potenz hinsichtlich der Kognitionsverbesserung bleibt daher unklar.

Das bivalente Hexahydrodibenzazecin-Derivat **B1** zeigte im *Open Field*-Test ebenfalls eine dosisabhängige Abnahme der Lokomotion ($ED_{50} = 0,19$ mg/kg Körpergewicht), sowie eine Reduktion des Putzverhaltens bei unverändertem Kotabsetzen. Zudem deuten erste Ergebnisse im Stabsprung-Versuch, einem einseitigen, aktiven *Conditioned Avoidance Response*-Test (zur Methode siehe **Publikation 3**; Kapitel 1.4.1), auf eine neuroleptische Potenz hin und beweisen damit auch die ZNS-Gängigkeit dieser Substanz.

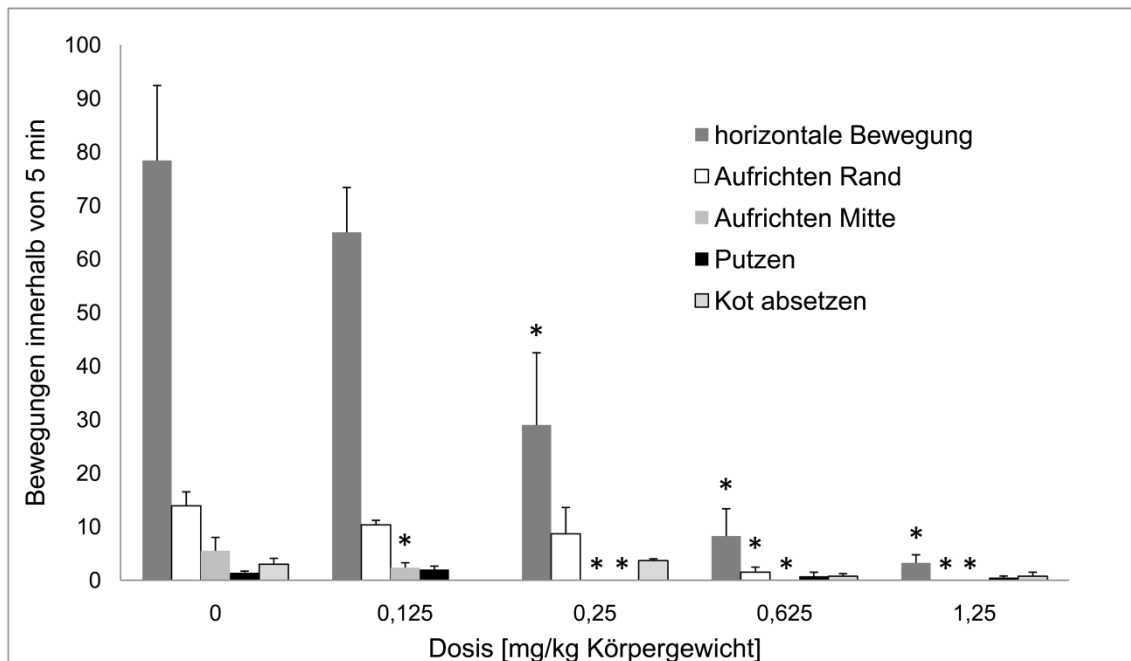


Abbildung 3.6.3 Ergebnisse des *Open Field*-Tests mit Verbindung B1

Mittelwert + SEM, 30 min nach Substanzgabe, 5 Ratten je Dosis, *-signifikante Veränderung zur Kontrolle ($p < 0,05$)

4 Gesamtdiskussion

Die Zusammenführung von Dopamin- und Serotonin-Grundstrukturen in ein Molekül führte zu zweifach aromatisch kondensierten Azecinen, die hohe Affinitäten an Dopamin und Serotonin-Rezeptoren aufwiesen (Hoefgen 2006; Mohr 2006; Enzensperger 2008). In früheren Arbeiten konnten durch Strukturvariationen Benzindolo- und Dibenzannelierung sowie eine Methylgruppe am Azecin-Stickstoff als optimal für die Bindung an Dopamin-Rezeptoren evaluiert werden (vgl. Kapitel 1.5).

In dieser Arbeit sollten diese Strukturoptimierungen noch erweitert und die bisannelierten Azecine pharmakologisch im Tiermodell untersucht werden. In den folgenden Kapiteln sind die einzelnen Strukturvariationen näher beschrieben und die Ergebnisse der Publikationen zusammengefasst.

4.1 Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Bisher untersuchte affine biskondensierte Azecine zeigten alle einen Abstand der beiden aromatischen Systeme von nur einer Methylengruppe und ein *[d,g]*-Annelierungsmuster. In dieser Arbeit wurde diese starre Vorgabe überprüft, indem der Einfluss von anderen Positionen des Aromaten auf die Affinitäten an Dopamin-Rezeptoren durch Synthese von Hexahydrodibenzazecinen mit anderem Annelierungsmuster untersucht wurde (vgl. **Publikation 1**).

Versuche zur Ringerweiterung von Hexahydrodibenzo*[d,g]*azecinen zu 11-Ring-Derivaten (Enzensperger 2007b) wurden auf die entstandenen Hexahydrodibenzo*[c,g]*azecine übertragen. Die Ergebnisse aus Radioligandbindungsstudien mit diesen neu synthetisierten 11-Ring-Homologen wurden auch anhand von *in silico*-Vermessungen an energieminierten Konformationen diskutiert (vgl. **Publikation 2**).

Desweiteren wurden bivalente Verbindungen von LE404 und seinen Vorstufen synthetisiert. Die homobivalenten *[d,g]*-Azecin-Derivate zeigten nicht nur an Dopamin-Rezeptoren erstaunliche Ergebnisse, sondern inhibierten auch im mikromolaren Bereich Cholinesterasen. Bivalente Derivate von Tetrahydrodibenzochinolizinen und Tetrahydrodibenzochinolizinium-Verbindungen hemmten die Cholinesterasen sogar in nanomolaren Konzentrationen (vgl. **Publikation 4**). In Tierversuchen konnte auch die ZNS-Gängigkeit bivalenter *[d,g]*-Azecine und -Chinolizine belegt werden.

Indol-*N*-substituierte Verbindungen zeigten erstaunliche Affinitäten an Dopamin-Rezeptoren (Enzensperger 2006). Es lag daher die Vermutung nahe, dass kleine Substituenten zwischen den Aromaten die Affinitäten an Dopamin-Rezeptoren steigern könnten. Dies wäre entweder durch

eine Vergrößerung des Abstandes zwischen den Aromaten oder durch Ausfüllen von noch freiem Platz in der Rezeptortasche zu erklären. Es wurden daher Verbindungen synthetisiert, die entweder direkt an der Methylengruppe zwischen den Aromaten oder am C1 substituiert waren (vgl. **Publikation 5**).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zudem quartäre Ammoniumverbindungen hinsichtlich ihrer Affinitäten zu Dopamin-Rezeptoren untersucht, da eine partielle Protonierung der Liganden mit tertiärem, basischem Stickstoff am Wirkort sehr wahrscheinlich ist. Bei den in diesem Zusammenhang synthetisierten Verbindungen handelte es sich insbesondere um quartäre Tetrahydrodibenzochinoliniziniumsalze als Vorstufen von Hexahydrodibenzazecinen, deren ringerweiterte Homologe, sowie *[d,g]*-Azeciniumsalze (vgl. Kapitel 3.1). Bei Syntheseversuchen zu Dopamin-Agonisten (vgl. Kapitel 3.3) entstand ein 7-Propylderivat der bekannten *[d,g]*-Azecine.

In Abbildung 4.1.1 sind alle synthetisierten Strukturvariationen aufgeführt.

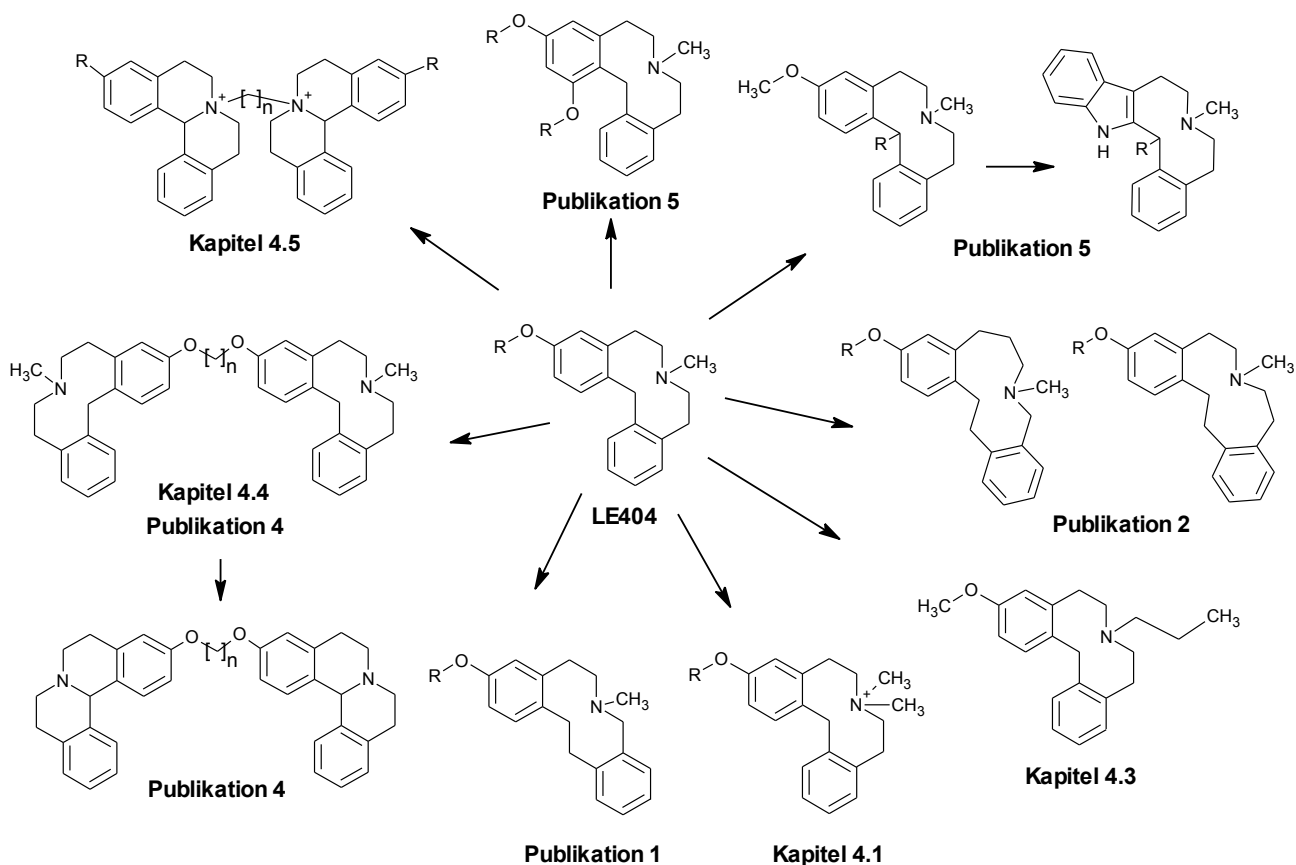


Abbildung 4.1.1 Im Rahmen dieser Arbeit synthetisierte neue Verbindungen ausgehend von der Leitstruktur LE404

Die synthetisierten Verbindungen wurden in Radioligandbindungsstudien an humanen Dopamin-Rezeptoren (D_1 - D_5), die stabil in HEK- bzw. CHO-Zellen exprimiert waren, getestet. Über einen Calciumassay wurde bestimmt, ob es sich bei den Verbindungen um Agonisten, Antagonisten oder inverse Agonisten handelt. Die Verfahren sind detailliert in **Publikation 1** beschrieben.

4.1.1 Modifikation des Annelierungsmusters

Die $[d,g]$ -Chinolizin-Vorstufen der bisher untersuchten $[d,g]$ -Azecine zeigten bis zu einer Konzentration von 10 μM an Dopamin-Rezeptoren keine Affinität, während anders annelierte Tetrahydrodibenzochinolizin-Verbindungen, wie zum Beispiel Chlorscoulerin oder Stepholidin (Abbildung 4.1.2) hoch affine Dopamin-Liganden mit zum Teil agonistischen Eigenschaften am D_1 -Rezeptor darstellen (Lovenberg 1989; Jin 2002). Die in dieser Arbeit durchgeführte Ringöffnung Chlorscoulerin-artiger Tetrazyklen zu $[c,g]$ -Azecinen führte nicht wie erwartet zu hoch affinen Liganden am Dopamin-Rezeptor. Auch die in diesem Zusammenhang untersuchten Hexahydrodibenzo $[c,f]$ azecine, die eine ringgeöffnete Variante des hochaffinen D_1 -Agonisten Dihydropyridin darstellen (Abbildung 4.1.2), wiesen deutlich geringere Bindungsaffinitäten als das zum Vorbild genommene tetrazyklische Molekül auf.

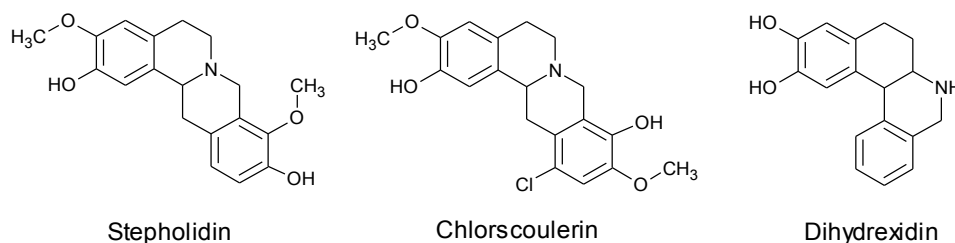


Abbildung 4.1.2 Aktive tetrazyklische Dopamin-Rezeptor-Liganden

Um einen Vergleich der verschiedenen Annelierungsmuster zu ermöglichen, wurden jeweils gleich substituierte Derivate von Hexahydrodibenzo $[d,g]$ -, $-[c,g]$ - und $-[c,f]$ azecinen synthetisiert und in Radioligandbindungsstudien an Dopamin-Rezeptoren untersucht (Abbildung 4.1.3).

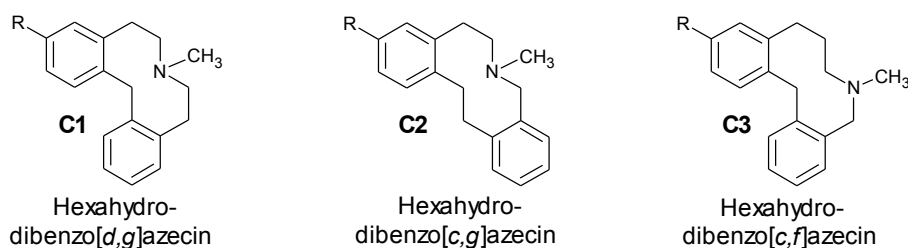


Abbildung 4.1.3 Hexahydrodibenzazecine mit verschiedenen Annelierungsmustern ($R = \text{OH}, \text{OCH}_3$)

Die untersuchten Chinolizin- und Azecin-Derivate zeigten ausnahmslos antagonistische Eigenschaften an allen Dopamin-Rezeptoren. So scheint nicht das Annelierungsmuster, sondern vor allem die Substitution an den Aromaten die Funktionalität zu beeinflussen (vgl. Kapitel 3.3). Hin- gegen war die Affinität zu Dopamin-Rezeptoren stark an das $[d,g]$ -Annelierungsschema gebunden.

Eine Veränderung der Positionen der Aromaten am $[d,g]$ -Azecin-Grundgerüst führte generell zur Affinitätsabnahme (vgl. **Publikation 1**). Während an D_1 - und D_5 -Rezeptoren noch Affinitäten im einstelligen μM Bereich gemessen wurden, trat an den anderen Dopamin-Rezeptoren keine Affinität bis zu 10 μM auf. Daher führte die Ringöffnung bei $[c,g]$ - und $[c,f]$ -Derivaten (**C2**, **C3**) zu

einer gesteigerten D_1/D_5 -Selektivität. Interessanterweise zeigten bei einer $[c,g]$ -Annelierung die Tetrahydrodibenzochinolizin-Analoga eine höhere Affinität zu Dopamin-Rezeptoren als die entsprechenden $[c,g]$ -Azecine (**C2**). Bei den starren tetrazyklischen Verbindungen hatten die $[c,g]$ -Derivate die höchsten Affinitäten, während für die flexibleren, aber vermutlich auch raumgreifenderen Hexahydrodibenzazecine eine $[d,g]$ -Annelierung für die Bindung an Dopamin-Rezeptoren günstiger erscheint.

Es konnte daher nachgewiesen werden, dass die höhere Flexibilität der Hexahydrodibenzazecine gegenüber den Tetrahydrodibenzochinolizinen nicht zwangsläufig zu einer gesteigerten Affinität am Rezeptor führt.

Auffallend war, dass 2-Methyl-1-(2-methylbenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-Derivate als Nebenprodukte der Synthese von $[c,g]$ -Azecinen (Abbildung 4.1.4, **C4**) an D_1 -Rezeptoren ähnliche Affinitäten aufwiesen wie die $[c,g]$ -Azecine selbst. Hingegen ergaben Messungen des Tetrahydroisochinolin-Derivats **C5** keine Affinitäten an Dopamin-Rezeptoren bis zu einer Konzentration von 10 μM (Abbildung 4.1.4). Letzteres entstand aus einer alternativen Spaltungsvariante der C-N-Bindung durch einen *Hofmann*-Abbau mit nachfolgender katalytischer Hydrierung.



Abbildung 4.1.4 Nebenprodukte der Synthese von $[c,g]$ -Azecinen

Synthese ausgehend von 7-Methyl-5,8,13,13a-tetrahydro-6*H*-isochino[3,2-*a*]isochinolium-Derivaten durch *Birch*-Reduktion (**C4**, R=H, CH₃) bzw. *Hofmann*-Abbau mit anschließender katalytischen Hydrierung (**C5**)

4.1.2 Ringerweiterung von Hexahydrodibenzo[c,g]azecinen

Ausgehend von den untersuchten $[c,g]$ -Azecinen erfolgte eine Ringerweiterung zu 11-Ring-Homologen (Abbildung 4.1.5). In **Publikation 2** wurden diese neuen heterocyclischen Ringsysteme erstmals beschrieben.

Ringerweiterungen von $[c,g]$ -Azecinen zu 11-Ring-Homologen ergaben für die Erweiterung des C-Rings zu Verbindung **C10** erhöhte Affinitäten an D_4 -Rezeptoren und leichte Affinitätssteigerungen an D_1 -Rezeptoren, während an D_3 -Rezeptoren die Affinitäten dramatisch abnahmen (Abbildung 4.1.5). Die D_1/D_5 -Selektivität, welche für alle Hexahydrodibenzazecine beobachtet werden konnte, blieb erhalten. Wie auch schon für aromatisch annelierte $[d,g]$ -Azecine gezeigt (Enzensperger 2007b), führte eine Erweiterung des B-Rings (**C7**) zu drastischen Affinitätsverlusten (vgl. **Publikation 2**).

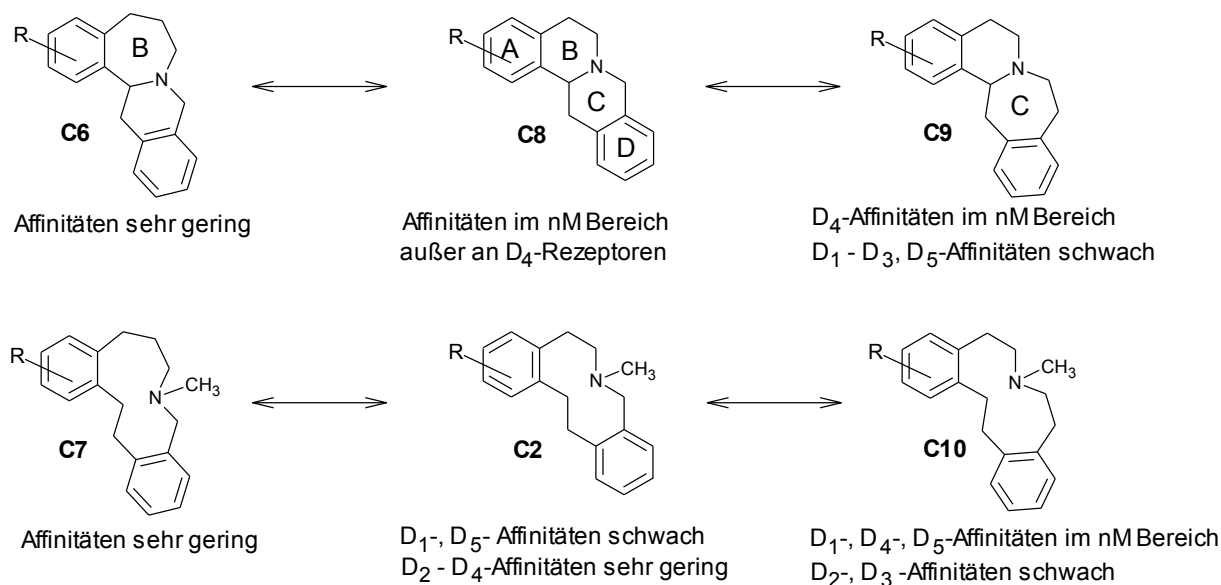


Abbildung 4.1.5 Ringerweiterungen an Hexahydrodibenzo[*c,g*]azecinen und Tetrahydrodibenzochinolizinen (R = H, OCH₃, OH)

Interessant waren die Ergebnisse an Dopamin-Rezeptoren für die tetrazyklischen Derivate (Abbildung 4.1.5, **C6**, **C9**). Während die B-Ring-Erweiterung zu Verbindung **C6** wiederum zu einem Affinitätsverlust führte, zeigten die C-Ring-erweiterten Derivate **C9** Affinitäten im dreistellig nanomolaren Bereich sowie eine deutliche D₄-Selektivität. Die Bedeutung des D₄-Rezeptors in der Behandlung von Schizophrenie wird noch immer diskutiert (de Almeida 2008). Zum einen weist Clozapin als potentes Neuroleptikum mit guten Wirkungen gegen die Negativsymptomatik auch eine D₄-Selektivität auf und zum anderen stellten *Seeman et al.* (1993) eine Erhöhung der D₄-Rezeptordichte *post mortem* in Gehirnen von Schizophrenie-Patienten fest. Die D₄-selektive Verbindung 5,6,8,9,14,14a-Hexahydroisochino[1,2-*b*][3]benzazepin (**C9**, R= H) könnte als Grundstruktur für die Entwicklung höher affiner D₄-Liganden herangezogen werden, welche für die Erforschung der Bedeutung von D₄-Rezeptoren nötig sind.

In silico-Studien legen nahe, dass die stärker gewinkelte Konformation der C-Ring-erweiterten tetrazyklischen Derivate (**C9**) für die höheren Affinitäten gegenüber den gestreckteren B-Ring-erweiterten Homologen verantwortlich ist (vgl. **Publikation 2**). So zeigten die affinen [c,g]-annelierten Derivate **C8** und **C9** einen deutlich geringeren Abstand zwischen den beiden Aromaten und eine insgesamt stärker gewinkelte Konformation als die wenig affinen B-Ring-erweiterten Derivate **C6**.

4.1.3 Substitution zwischen den Aromaten

Die Einführung kleiner Substituenten am Indol-Stickstoff des LE300 erwies sich als vorteilhaft für die Affinität an Dopamin-Rezeptoren, während längere Reste sich ungünstig auf die Rezeptor-Bindung auswirkten (Robaa 2010b). Um den Einfluss kleiner Substituenten, die sich zwischen den Aromaten befinden, genauer einschätzen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit am C1 substituierte *[d,g]*-Azecine synthetisiert (Abbildung 4.1.6). Zudem wurden über *Grignard*-Reaktionen *[d,g]*-Azecine mit Methyl- und Ethylgruppen am C6 des Azecinrings erhalten (vgl. **Publikation 5**).

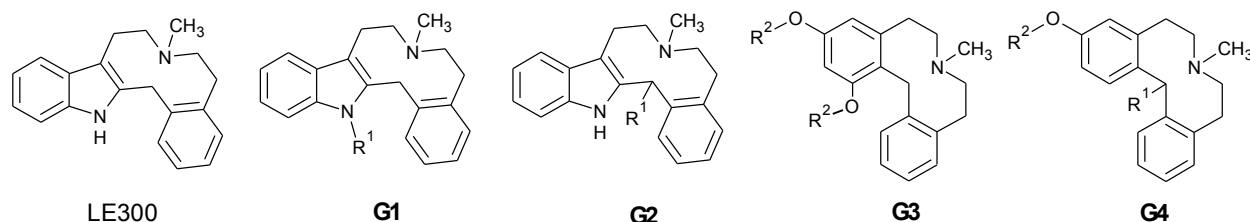


Abbildung 4.1.6 Synthetisierte Verbindungen mit Substituenten zwischen den Aromaten
($R^1 = \text{CH}_3, \text{CH}_2\text{CH}_3$; $R^2 = \text{H}, \text{CH}_3$)

Es war auffällig, dass sich die Affinitäten an D_1 - und D_5 -Rezeptoren durch die zusätzliche Substitution kaum veränderten, teilweise sogar verbessert wurden, während die Affinitäten zu D_2 -, D_3 -, und D_4 -Rezeptoren zum Teil drastisch abnahmen. Die Substitutionen am Aromaten (vgl. Verbindungen **G1**, **G3**) waren für die Bindung an D_2 - und D_4 -Rezeptoren deutlich weniger nachteilig als die Substitutionen an der Methylengruppe zwischen den beiden Aromaten (vgl. Verbindungen **G2**, **G3**). Außer der *N*-Methylierung am Indol-Stickstoff des LE300 (**G1**, $R = \text{CH}_3$), führten an D_3 -Rezeptoren alle Substitutionen zwischen den Aromaten zu deutlichen Affinitätseinbußen.

In silico-Vermessungen ergaben für die Verbindungen mit zusätzlichen Substituenten eine leichte Abstandserweiterung zwischen den Aromaten (vgl. **Publikation 5**). Wie in Kapitel 4.1.2 für ring-erweiterte Homologe der *[c,g]*-Chinolizine bereits beschrieben wurde, wird eine Streckung des Moleküls insbesondere an D_2 -, D_3 - und D_4 -Rezeptoren weniger toleriert, was sich in den Bindungsaffinitäten widerspiegelt. Insgesamt sind die Konformationsveränderungen gegenüber den Derivaten ohne zusätzliche Substitution zwischen den Aromaten jedoch nur marginal. So ist zu vermuten, dass der Einfluss der Konformationsveränderung auf die Affinitäten eher gering ist. Damit scheint der Raum in den Bindungstaschen der Rezeptoren ausschlaggebend für die Tolerierung der zusätzlichen Substituenten an diesen Positionen zu sein. Anhand der Bindungsaffinitäten ist davon auszugehen, dass ausschließlich an D_1 - und D_5 -Rezeptoren dieser Raum für zusätzliche kleine Substituenten noch vorhanden ist. Desweiteren kann geschlussfolgert werden, dass sich die Konformationen der Bindungstaschen zwischen den der D_1 -Familie zugeordneten D_1 - und D_5 -Rezeptoren und der in der D_2 -Familie zusammengefassten D_2 -, D_3 - und D_4 -Rezeptoren an dieser Stelle unterscheiden.

4.1.4 Bivalente Verbindungen

Der Strategie des *Bivalent Ligand Approach* folgend, wurden dimere $[d,g]$ -Chinolizine, $[d,g]$ -Chinoliziniumsalze und $[d,g]$ -Azecine mit unterschiedlich langen Alkylspacern synthetisiert.

Ausgehend von Überlegungen zur Wirkung bivalenter Strukturen (vgl. Kapitel 1.6), erhoffte man sich insbesondere für die $[d,g]$ -Azecine hohe Affinitäten an Dopamin-Rezeptoren. Eine Dimerisierung des Benzindoloazecins LE300 in früheren Arbeiten führte zu kettenlängenabhängigen submikromolaren K_i -Werten, nicht aber die Dimerisierung von Hexahydrodibenzazecinen über den tertiären Azecin-Stickstoff (Abadi 2002; Wittig 2004). Daher wurden über *Williamsonsche* Ethersynthese, anschließende Quartärnisierung und *Birch*-Reduktion Sauerstoff-verknüpfte bivalente Derivate der Hexahydrodibenzazecine mit verschiedenen Kettenlängen ($n = 3-12$) synthetisiert (Abbildung 4.1.7, **B1-B3**).

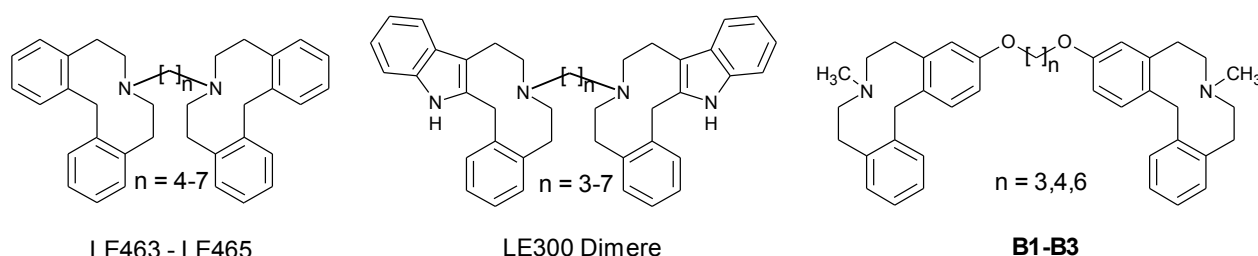


Abbildung 4.1.7 Dimere Verbindungen von $[d,g]$ -Azecinen

Die so erhaltenen neuen Verbindungen **B1-B3** zeigten erstaunlich hohe Affinitäten zu Dopamin-Rezeptoren im nanomolaren Bereich, insbesondere für eine Kettenlänge von $n = 3$ (vgl. Kapitel 3.4). Mit zunehmender Kettenlänge wurden die Affinitäten geringer. Diese kurze Kettenlänge als Optimum war nicht unerwartet. Bei den oben erwähnten *N*-verknüpften bivalenten $[d,g]$ -Azecinen waren Kettenlängen von $n = 5$ (für LE463-LE465) und $n = 6$ (für dimere Derivate von LE300) optimal für die Bindungsaffinitäten und hatten durch die fehlenden Sauerstoffatome in den Ketten damit ungefähr den gleichen Abstand zwischen den beiden monomeren Teilstrukturen. Hohe Bindungsaffinitäten bivalenter Liganden können zum einen auf einer zweiten Bindungsstelle am Rezeptor beruhen, zum anderen möglicher Weise di- bzw. oligomere Rezeptoren überbrücken (Zhang 2007a). Allerdings sind die ermittelten optimalen Spacerlängen wesentlich kürzer, als für eine Verbrückung von möglichen Rezeptordimeren nötig wäre. Die außergewöhnlichen Affinitäten an Dopamin-Rezeptoren, insbesondere des Sauerstoff-verknüpften Derivates mit einer Spacerlänge von $n = 3$ (Maximalabstand zwischen den Monomeren = 7,3 Å), lassen daher vermuten, dass eines der beiden monomeren Teilstrukturen an einer weiteren Bindungsstelle am Rezeptor bindet.

Desweiteren fiel auf, dass die Sauerstoff-überbrückten $[d,g]$ -Azecine **B1-B3** bei vergleichbaren Abständen zwischen den Monomeren deutlich höhere Affinitäten zu Dopamin-Rezeptoren zeigten

als die *N*-verknüpften Derivate. Dies weist auf eine wesentliche Bedeutung des Stickstoffatoms für die Bindung am Rezeptor hin. Sauerstoff-verknüpfte bivalente Verbindungen von Tetrahydrodibenzochinolizinen (Abbildung 4.1.8, **B8-B13**) oder -chinoliziniumsalzen (Abbildung 4.1.8, **B14-B19**) zeigten analog ihren monomeren Verbindungen keine messbaren Affinitäten an Dopamin-Rezeptoren bis 10 μM . Die von Zhang (2007a) postulierten Grundvoraussetzungen für die Entwicklung potenter bivalenter Liganden an GPCRs, wie Verwendung von aktiven Monomeren sowie optimierte Spacerlängen, konnten somit auf die Substanzklasse der [*d,g*]-Azecine angewendet und bestätigt werden.

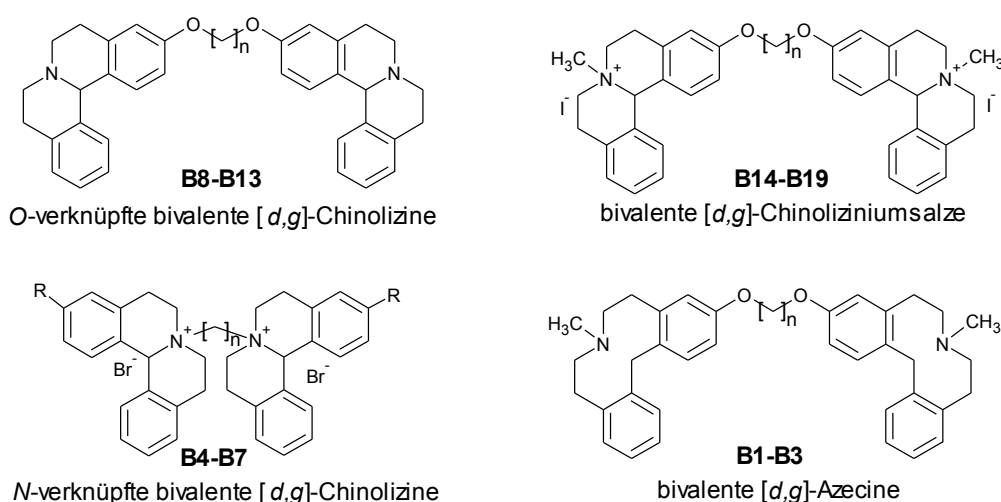


Abbildung 4.1.8 Strukturen neuartiger bivalenter Verbindungen als Cholinesterase-Inhibitoren
(B1-B7: $n = 3, 4, 6$; B8-B19 $n = 3-6, 8, 12$; R = H, OCH_3)

Ausgehend von der strukturellen Ähnlichkeit der monomeren Verbindungen zu Galantamin (Abbildung 4.1.9), einem therapeutisch genutzten Cholinesterase-Inhibitor, wurden die bivalenten [*d,g*]-Chinolizin- (**B8-B13**), [*d,g*]-Chinolizinium- (**B14-B19**) und [*d,g*]-Azecin-Derivate (**B1-B3**), je mit verschiedenen Kettenlängen, in einem *Ellman*-Assay an Acetyl- (AChE) und Butyrylcholinesterase (BChE) getestet (vgl. **Publikation 4**). Eine inhibierende Wirkung an Cholinesterasen durch Neuroleptika könnte einen zusätzlichen positiven Effekt auf kognitive Symptome bei Schizophreniepatienten bewirken (vgl. Kapitel 1.3).

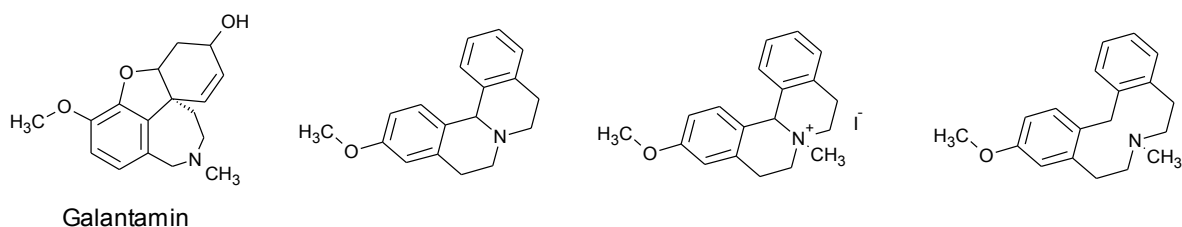


Abbildung 4.1.9 Strukturelle Ähnlichkeit von Galantamin und monovalenten Strukturen

Alle untersuchten bivalenten Strukturen zeigten hohe inhibitorische Aktivitäten an beiden Enzymen, während die Monomere wesentlich geringere Aktivitäten aufwiesen. Die Sauerstoff-überbrückten Derivate hemmten die Enzyme in wesentlich stärkerem Ausmaß als die *N*-verknüpften Derivate. Röntgenstrukturdaten des Enzyms mit gebundenen Inhibitoren belegen,

dass das quartäre bzw. protonierte Stickstoffatom für die Wechselwirkung mit Aminosäuren in der Bindungstasche der Cholinesterasen mit verantwortlich ist (Holzgrave 2007). Eine Schwächung der Bindung an das Enzym ist somit für *N*-verknüpfte Derivate durch die räumliche Abschirmung des Stickstoffs verständlich. Aufgrund dieser Überlegung wurden weitere Untersuchungen auf die Sauerstoff-verknüpften Derivate beschränkt.

Interessanterweise zeigten die ungeladenen und daher aller Wahrscheinlichkeit nach besser Blut-Hirn-Schranken-gängigen bivalenten [d,g]-Chinolizin-Derivate **B8-B13** höhere inhibitorische Aktivitäten an der BChE als die geladenen Moleküle (**B14-B19**) und zudem eine bis zu 76-fache Selektivität für diese Cholinesterase. Eine Bedeutung der Hemmung der BChE wird unter anderem in Zusammenhang mit der Alzheimerschen Erkrankung diskutiert. Insbesondere im fortgeschrittenen Stadium könnte die vermehrte Hemmung der BChE von Vorteil sein, da die Konzentration von AChE im Verlauf der Erkrankung im Gehirn abnimmt und damit auch die Potenz von AChE-selektiven Inhibitoren, während die BChE-Konzentration drastisch ansteigt (Giacobini 2003). Zudem haben sich durch BChE-Inhibitoren deutliche Verbesserungen der Kognition gezeigt (Greig 2005). Es war auffallend, dass die ungeladenen Verbindungen (**B8-B13**) eine deutliche Kettenlängenabhängigkeit der inhibitorischen Potenz aufwiesen, während sich bei den geladenen Verbindungen (**B14-B19**) nur relativ kleine Unterschiede bei verschiedenen Spacerlängen sowohl an der AChE als auch an der BChE zeigten. Dies spricht, wie auch kinetische Untersuchungen belegen, nicht für eine Interaktion mit einer zweiten Bindungsstelle (vgl. **Publikation 4**).

Hinsichtlich hoher Affinitäten an beiden Cholinesterasen, Selektivität für die BChE, geringer Toxizität und potenzieller Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit, zeigte das bivalente Tetrahydrodibenzochinolizin-Derivat mit einer Kettenlänge von $n = 6$ die besten Eigenschaften als potenzielles Kognition förderndes Therapeutikum. *In vivo*-Untersuchungen an Ratten in einem *Radial Maze*-Experiment konnten leider nicht ausgewertet werden, da die Substanz die lokomotorische Aktivität stark einschränkte. Diese Lokomotionsminderung konnte nachfolgend in einem *Open Field*-Test als dosisabhängig und signifikant charakterisiert werden (vgl. Kapitel 3.6). In Dosen, in denen die Lokomotion nicht beeinträchtigt war (zehnfach unter der Standarddosierung von Tacrin in diesem Test), konnte kein positiver Effekt auf die Scopolamin-induzierte Gedächtnisstörung nachgewiesen werden. Neben der relativ geringen verabreichten Dosis ist hierbei zu bedenken, dass sich der Tierversuch ausschließlich auf die inhibitorische Aktivität an der AChE bezieht, während sich die in dieser Arbeit entwickelten Substanzen durch ihre besonders hohe BChE-Selektivität auszeichnen.

Die Reduzierung der lokomotorischen Aktivität ohne sichtbare Bewegungsabnormalitäten, die auf einen peripheren Effekt an den Muskeln hindeuten würden, lässt eine zentrale Wirkung vermuten. Trotz des relativ großen Molekulargewichtes scheint daher die Substanz die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, was zur Entwicklung weiterer bivalenter Verbindungen ermutigt. Dieses Ergebnis sollte jedoch weiterführend auch in gängigen Blut-Hirn-Schranken-Modellen belegt werden.

4.1.5 Quartäre Strukturen

Verbindungen mit basischem Stickstoffatom liegen bei physiologischem pH-Wert zum Teil auch in der protonierten Form vor. Für die Bindung an Dopamin-Rezeptoren scheint solch ein basischer, tertiärer Stickstoff essentiell zu sein. Dafür finden sich in der Literatur insbesondere für den D₂-Rezeptor mehrere Erklärungen. Zum einen konnte durch *in silico*-Studien, aber auch durch den Austausch einzelner Aminosäuren des Rezeptors eine Salzbrücke zwischen dem Aspartat 114 in der Transmembranregion 3 (auch bezeichnet als D3.32) und der Aminogruppe von Dopamin bzw. Dopamin-Rezeptor-Liganden nachgewiesen werden (Mansour 1992; Kalani 2004). Desweiteren wurde kürzlich für den D₂-Rezeptor eine Kationen- π -Wechselwirkung zwischen dem Tryptophan W6.48 und dem durch Protonierung positiv geladenen Stickstoffatom der Liganden postuliert (Torrice 2009). Wahrscheinlich ist daher auch die protonierte Form der *[d,g]*-Azecine durch Wechselwirkung des Stickstoffes mit dem Rezeptor für die hohen Rezeptoraffinitäten mit verantwortlich. Um dies genauer untersuchen zu können, wurden permanent geladene *[d,g]*-Azecin-Derivate (**Q1-Q3**), aber auch tetrazyklische Vorstufen der *[d,g]*- und *[c,g]*-Azecine mit Ammoniumsalz-Partialstruktur (Abbildung 4.1.10) synthetisiert und deren Affinitäten zu den einzelnen Dopamin-Rezeptoren bestimmt (vgl. Kapitel 3.1).

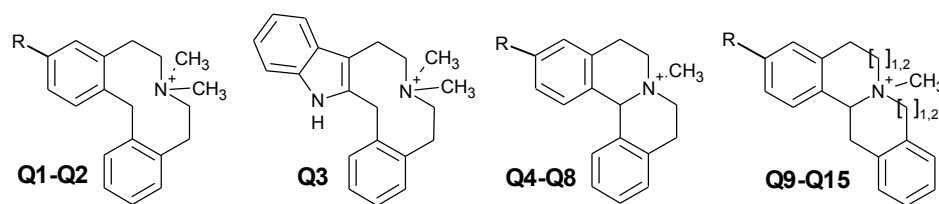


Abbildung 4.1.10 An Dopamin-Rezeptoren untersuchte quartäre Strukturen

Alle quartären Verbindungen (**Q1-Q15**) waren wesentlich weniger affin zu Dopamin-Rezeptoren als ihre ungeladenen Vorstufen mit protonierbarem Stickstoff. Die höchsten Affinitäten zeigten sich für einige quartäre Salze am D₁-Rezeptor im mikromolaren Bereich, während bei fast allen Verbindungen an D₂-D₅-Rezeptoren keine Affinitäten bis zu einer Konzentration von 10 μ M auftraten. Die Ergebnisse könnten vermuten lassen, dass die *[d,g]*-Azecine, aber auch die affinen Tetrahydro-dibenzo[*c,g*]chinolizine nicht vorrangig im protonierten Zustand an die Dopamin-Rezeptoren binden. Die Ausgangsüberlegung, dass auch quartäre Ammoniumsalze eine relativ starke Bindung an die auf der Zelloberfläche befindlichen Rezeptoren hätten, falls Kationen- π -Wechselwirkungen zur Bindung des Stickstoffes nötig wären, ist allerdings nur teilweise richtig. Es muss berücksichtigt werden, dass sowohl die Ladungsdichte am Stickstoff im methylierten und protonierten Zustand, also auch der Raumanspruch durch Protonen und Methylgruppen verschieden sind.

Es zeigten ausschließlich Substanzen, deren nichtquartäre Vorstufen messbare Affinitäten zu den Rezeptorsubtypen aufwiesen, noch Affinitäten zu den Rezeptoren, insbesondere an D₁. Dies ist

nicht verwunderlich, da die grundsätzliche Konformation der Verbindungen sich durch die zusätzliche Methylgruppe nicht verändert.

Insgesamt konnten somit trotz der als gesichert geltenden Salzbrücke zwischen basischem Stickstoff in protonierter Form und dem Aspartat D3.32, für die quartärnierten Verbindungen nahezu keine Affinitäten an Dopamin-Rezeptoren gefunden werden. Es konnte mit diesem Ansatz daher weder die erwähnt Salzbrücke noch eine Kationen- π -Wechselwirkung am W6.48 für die [d,g]-Azecine bestätigt werden.

4.2 Zytotoxizitäten

Im Vorfeld zu den *in vivo*-Studien wurden Toxizitätstests an humanen Glia- und neuronalen Zellen mit einer repräsentativen Auswahl affiner Hexahydrodibenzazecine, Tetrahydrodibenzochinolizine und ringerweiterter Homologen durchgeführt, um deren Unbedenklichkeit zu belegen. Die Zytotoxizität *in vitro* ist hierbei nicht direkt auf *in vivo* übertragbar und auch eine geringe Zytotoxizität schließt nicht andere toxische Effekte der Substanzen, wie etwa Organschädigungen, aus. Dennoch liefern diese leicht durchführbaren *in vitro*-Versuche Hinweise auf mögliche schädigende Wirkungen.

Die Leitstrukturen LE300 und LE404 sowie das 3-Methoxy-substituierte Hexahydrodibenzo-[d,g]azecin LE425 (Abbildung 4.2.1) zeigten keinerlei Zytotoxizität bei 100 μM und eine halb-maximale Viabilitätsminderung (CC_{50}) bei Konzentrationen über 250 μM (vgl. **Publikation 3**).

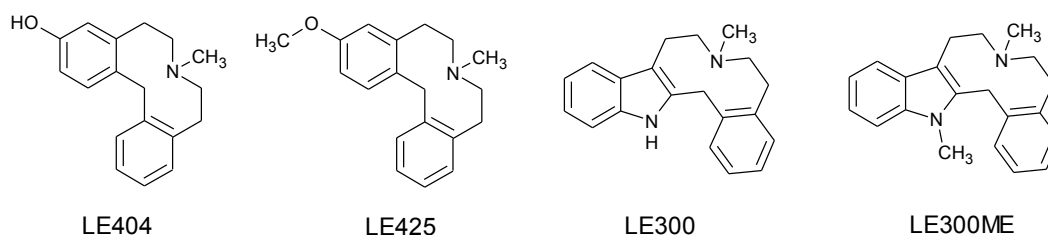


Abbildung 4.2.1 Strukturen von LE404, LE425, LE300 und LE300ME

Führt man am Indol-Stickstoff des LE300 aliphatische Ketten als Substituenten ein, so erhöht sich die Toxizität mit steigender Kettenlänge. LE300ME (Abbildung 4.2.1) verursachte die geringste Viabilitätsminderung von allen Indol-N-substituierten Derivaten des LE300 ($\text{CC}_{50} = 139.6 \pm 22.7 \mu\text{M}$) (vgl. **Publikation 3**).

Bivalente Verbindungen, die aufgrund ihrer erstaunlich hohen Affinitäten an Dopamin-Rezeptoren bzw. hohen inhibitorischen Aktivitäten an Cholinesterasen ebenfalls für Tierversuche in Frage kamen, erwiesen sich als wesentlich zytotoxischer als die monovalenten Derivate

(vgl. **Publikation 4**). Auffallend war zudem die starke Kettenlängenabhängigkeit der Viabilitätsminderung (Abbildung 4.2.2).

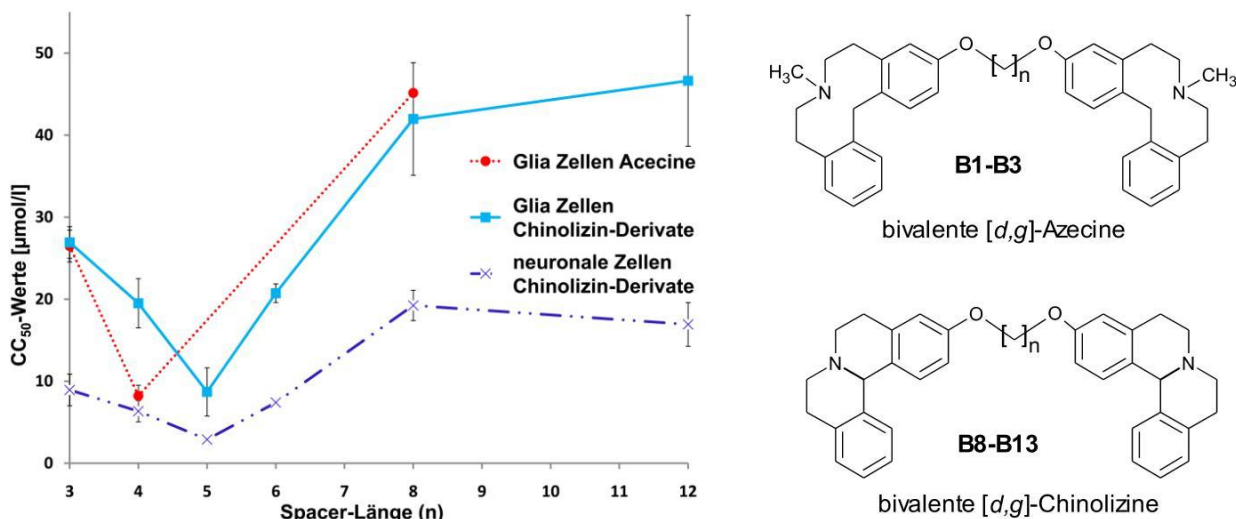


Abbildung 4.2.2 Abhängigkeit der Zytotoxizität von der Spacer-Länge bei bivalenten Verbindungen

In intensiven Untersuchungen an *[c,g]*-Azecinen, *[c,g]*-Chinolizinen und deren ringerweiterten Homologen konnte festgestellt werden, dass die tetrazyklischen Verbindungen wesentlich weniger toxisch sind als die *[d,g]*-Azecine und Azacycloundecine selbst. Eine Substitution am Aromaten wirkte sich generell toxizitätssteigernd aus und eine Ringerweiterung insbesondere am C-Ring führte ebenso zu einer gesteigerten Zytotoxizität (vgl. **Publikation 2**).

Die Ergebnisse der Zytotoxizitätsstudien an menschlichen Gliazellen und Neuronen sind in Tabelle 4.2.1 zusammengefasst.

Tabelle 4.2.1 Ergebnisse der Zytotoxizitätstests

Substanzen	Toxizität
Hexahydrodibenzo- und -benzindolo- [d,g]azecine (LE404, LE300)	<ul style="list-style-type: none"> nicht zytotoxisch bis 250 µM
Indol- <i>N</i> -Substitution an LE300	<ul style="list-style-type: none"> mit steigender Kettenlänge höhere Zytotoxizität
Bivalente Verbindungen	<ul style="list-style-type: none"> kettenlängenabhängige Zytotoxizität höchste Zytotoxizität bei n = 5
Tetrahydrodibenzo[<i>c,g</i>]chinolizine und ringerweiterte Homologe	<ul style="list-style-type: none"> untoxisch bis 250 µM Ausnahme: C-Ring-erweitertes 3-Methoxy-Derivat
Hexahydrodibenzo[<i>c,g</i>]azecine und ringerweiterte Homologe	<ul style="list-style-type: none"> zytotoxischer als Dibenzo[<i>d,g</i>]azecine C-Ring-Erweiterung führt zu höherer Zytotoxizität als B-Ringerweiterung Substitution am Aromaten verstärkt Zytotoxizität

Die viabilitätsmindernden Effekte der Substanzen korrelierten nicht mit ihrer Wirksamkeit an den gewünschten Targets. Daher konnten Verbindungen identifiziert werden, die sowohl eine gute Wirksamkeit als auch eine geringe Toxizität bzw. ein gutes Verhältnis aus beidem aufweisen.

Einfache Hexahydrobenzindolo- und -dibenzo[*d,g*]azecine zeigten neben hohen Affinitäten an Dopamin- und Serotonin-Rezeptoren kaum Toxizität und sind daher gut für *in vivo*-Versuche geeignet. Bei den Indol-*N*-substituierten Derivaten kristallisierte sich LE300ME (Abbildung 4.2.1) als Substanz mit bestem Toxizitäts-Wirkungs-Index heraus. Unter den bivalenten Verbindungen war für die Cholinesterase-Inhibition eine Kettenlänge von $n = 6$ am günstigsten, während für die potenzielle Wirkung als Neuroleptikum das bivalente Azecin mit einer Kettenlänge von $n = 3$ aufgrund der höheren Affinitäten zu Dopamin-Rezeptoren zu bevorzugen ist. Die ringerweiterten Derivate der [c,*g*]-Azecine und -Chinolizine zeigen generell eher moderate Affinitäten zu Dopamin-Rezeptoren. Das beste Verhältnis aus Affinität und Toxizität zeigte hierbei das unsubstituierte 5,6,8,9,14,14a-Hexahydroisochino[1,2-*b*]benzazepin.

4.3 Tierversuche

4.3.1 Auswahl der Testsubstanzen

Die Auswahl der Substanzen für die Tierversuche erfolgte auf Basis der Ergebnisse von Radio-ligand-Bindungsexperimenten und Zytotoxizitätsstudien. Neben generell hohen Affinitäten und geringer Toxizität sollte ein möglichst breites Spektrum an Selektivitätsmustern für Dopamin-Rezeptoren abgedeckt werden. Es wurden daher die in Abbildung 4.3.1 dargestellten Verbindungen gewählt.

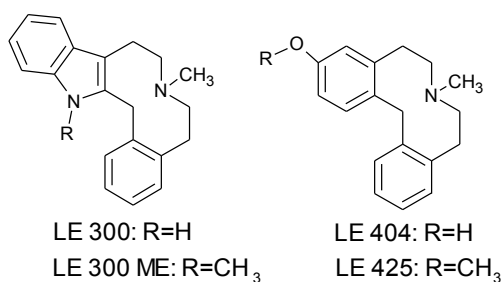


Abbildung 4.3.1 Substanzen für *in vivo*-Versuche

Als Referenzsubstanzen wurden Haloperidol als typisches und Risperidon als atypisches Neuroleptikum genutzt. Sie unterscheiden sich hauptsächlich in ihren Affinitäten zu 5-HT_{2A}-Rezeptoren (Tabelle 4.3.1). Haloperidol zeigt an allen Dopamin-Rezeptoren nanomolare Affinitäten und eine Selektivität für D₂- und D₃-Rezeptoren sowie eine geringe Affinität ($EC_{50} = 103 \pm 21$ nM) zu 5-HT_{2A} Rezeptoren, während Risperidon subnanomolare Affinitäten zum 5HT_{2A}-Rezeptor und Selektivität

zur gesamten D₂-Rezeptor Subfamilie (D₂, D₃, D₄) aufweist. Die Affinitäten von Risperidon an D₁- und D₅-Rezeptoren sind vergleichsweise gering im submikromolaren Bereich.

Tabelle 4.3.1 Radioligandbindungsdaten der *in vivo* getesteten Verbindungen

Substanzen	K _i [nM] ± SEM					
	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅	5-HT _{2A}
LE425	23,4 ± 5,2	13,0 ± 9,0	75,7 ± 7,3	43,4 ± 13,3	54 ± 20,5	4,42 ± 1,27
LE300	2,9 ± 0,9	9,2 ± 6,9	40,4 ± 14,5	50,1 ± 12,7	1,2 ± 0,4	0,13 ± 0,01
LE404	0,39 ± 0,16	17,5 ± 1,5	47,5 ± 16,3	7,4 ± 3,7	1,5 ± 0,5	0,67 ± 0,04
LE300ME	1,5 ± 0,8	8,2 ± 5,6	7,2 ± 2,8	13,2 ± 2,9	1,9 ± 0,1	0,36 ± 0,02
Risperidon	104 ± 43 ^a	4,8 ± 1,3 ^a	13,6 ± 0,5 ^a	12,1 ± 5,0 ^a	563 ^{a,*}	0,18 ± 0,02 ^a
Haloperidol	3,4 ± 1,8	0,28 ± 0,26	0,18 ± 0,03	3,5 ± 0,9	4,2 ± 0,3	103 ± 21

^aaus PDSP Datenbank (NIMH 2010) *Wert ohne Standardabweichung in Datenbank

Die untersuchten [*d,g*]-Azecine zeigten alle Affinitäten zum 5-HT_{2A}-Rezeptor vergleichbar mit der von Risperidon, jedoch weitaus höhere Affinitäten zur D₁-Rezeptor-Subfamilie (D₁ und D₅). Jede der vier Substanzen wies ein anderes Selektivitätsprofil auf, wie in **Publikation 3** erläutert ist.

4.3.2 Stabsprung

Zunächst wurde die Wirkung der Substanzen auf die Positivsymptomatik der Schizophrenie in einer Stabsprung-Apparatur untersucht (vgl. **Publikation 3**). Die in diesem Versuch getestete Inhibierung der *Conditioned Avoidance Response* (CAR) bei Ratten ist ein verlässlicher Parameter für die neuroleptische Potenz von Substanzen. Alle klinisch relevanten Neuroleptika hemmen CAR in Dosen, bei denen die natürliche Fluchtreaktion nicht beeinflusst wird (Wadenberg 1999).

Die in dieser Arbeit angewendete aktive einseitige *Avoidance* in einer Stabsprung-Apparatur hat viele Vorteile gegenüber anderen etablierten Testsystemen zur Bestimmung der neuroleptischen Potenz (vgl. hierzu Kapitel 1.4.1). So werden direkte Reaktionen des Tieres auf die Substanz ohne vorherige Gabe weiterer Pharmaka beobachtet. Interaktionen zwischen den applizierten Substanzen aber auch interindividuelle Unterschiede in der Reaktion der Tiere auf vorher verabreichte Pharmaka wie zum Beispiel Apomorphin, müssen somit nicht bedacht werden. Zudem werden in dem hier verwendeten Modell auch vom Dopamin-Rezeptor unabhängige Wirkungen berücksichtigt. Dadurch wird die Erschließung neuer Substanzklassen mit Wirkungen auf andere Rezeptoren möglich.

Tabelle 4.3.2 Ergebnisse des Stabsprung-Tests

Substanz	ED_{50} CAR [mg/kg]	95% CI
Haloperidol	0,20	0,16 – 0,24
LE404	0,32	0,22 – 0,46
Risperidon	0,61	0,48 – 0,76
LE300ME	0,71	0,60 – 0,85
LE300	0,94	0,78 – 1,14
LE425	2,51	1,91 – 3,31

8 Ratten je Dosis, CAR *Conditioned avoidance response*, CI Konfidenz-Intervall

Nach *intra-peritonealer* Gabe zeigte LE404 im Stabsprung-Experiment eine vergleichbar hohe Potenz wie Haloperidol, während LE300ME ähnlich potent war wie Risperidon (Tabelle 4.3.2, die Dosisangabe bezieht sich im Folgenden immer auf das Körpergewicht des Versuchstieres). LE300 und LE425 zeigten ebenfalls deutliche Effekte auf die CAR, allerdings erst in höheren Dosen. Dennoch reduzierten alle getesteten *[d,g]*-Azecine die CAR in Dosen, in denen die natürliche Fluchtreaktion noch nicht beeinflusst wurde. Dadurch konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen vier Verbindungen um potente Neuroleptika mit guter Wirkung gegen die Positivsymptomatik handelt.

Eine gute orale Bioverfügbarkeit ist für neue Antipsychotika unerlässlich. Daher wurde je ein dibenzo- (LE404) und ein benzindoloanneliertes Derivat (LE300ME) auch nach oraler Gabe über eine Schlundsonde im Stabsprung-Experiment getestet. Bei der Dosierung wurde sich an Literaturangaben zur oralen Gabe von Haloperidol orientiert (Nordstrom 1992), in der 4 mg/kg Haloperidol als ausreichende Dosis nach oraler Gabe verwendet wurde. Bereits bei 2,5 mg/kg hatte LE300ME signifikante Effekte auf die CAR bei allen getesteten Ratten (79,6 % CAR-Inhibition, $n = 4$). Bei Gabe von LE404 hingegen zeigten nur zwei von vier Ratten eine Wirkung auf die CAR. Eine Dosissteigerung auf 5 mg/kg führte zu ähnlichen Ergebnissen. Nur drei der acht getesteten Ratten zeigten eine signifikante Beeinflussung der CAR. Erst bei einer Dosis von 20 mg/kg wurde bei allen Ratten die CAR signifikant inhibiert ($n = 5$). Ausgehend von diesen sehr uneinheitlichen Ergebnissen kann eine interindividuelle Schwankung der oralen Bioverfügbarkeit vermutet werden, was durch größere Versuchsgruppen und Plasmaspiegelkontrollen noch belegt werden sollte. Möglich wäre ein Einfluss der phenolischen Hydroxygruppe von LE404 auf die Biotransformation, was in folgenden Arbeiten durch Verwendung leicht abspaltbarer Reste an der Hydroxygruppe untersucht werden sollte.

4.3.3 Lokomotorische Aktivität

Die Einschränkung der lokomotorischen Aktivität ist eine typische Nebenwirkung von Neuroleptika. Diese korreliert stark mit dem Auftreten einer Katalepsie und scheint zumindest teilweise mit der Inhibition der dopaminergen Weiterleitung im limbischen System zusammenzuhängen (Jorgensen 1994; Vasconcelos 2003). Für alle getesteten *[d,g]*-Azecine, inklusive einer bivalenten Verbindung (**B3**, Spacerlänge $n = 3$) und ebenfalls für ein bivalentes *[d,g]*-Chinolizin (**B11**, Spacerlänge $n = 6$) wurde eine dosisabhängige Reduktion der lokomotorischen Aktivität festgestellt (Tabelle 4.3.3).

Ungewöhnliche Bewegungsabläufe, die auf eine periphere Wirkung am Muskel hindeuten, wurden nicht beobachtet. Damit zeigten alle getesteten Verbindungen eine Wirkung im zentralen Nervensystem. Dies ist insbesondere für die bivalenten Verbindungen mit hohem Molekulargewicht bemerkenswert und sollte noch durch zusätzliche Untersuchungen in Blut-Hirnschranken-Modellen belegt werden.

Tabelle 4.3.3 Ergebnisse des Open Field-Versuches zur lokomotorischen Aktivität

Substanz	ED_{50} lokomotorische Aktivität [mg/kg]	95% CI
Risperidon	0,30	0,24 – 0,38
Haloperidol	0,10	0,04 – 0,25
LE425	2,09	1,21 – 3,61
LE404	0,41	0,34 – 0,64
LE300	0,74	0,58 – 0,93
LE300ME	1,72	1,22 – 2,41
Bivalentes Chinolizin	0,70	0,47 – 1,04
Bivalentes Azecin	0,19	0,11 – 0,31

8 Ratten je Dosis, CI Konfidenz-Intervall

Es könnte kritisiert werden, dass die Ergebnisse des Stabsprung-Versuches eigentlich nur die Hemmung der lokomotorischen Aktivität widerspiegeln. Da beide Effekte zumindest teilweise auf einer Hemmung der D_2 -Rezeptoren beruhen, ist eine Korrelation beider Parameter anzunehmen. Allerdings korreliert die Hemmung der Lokomotion nur schwach mit der Reduzierung der CAR ($r^2 = 0,65$, $p = 0,05$). Zudem tritt eine signifikante CAR-Inhibition bei manchen Substanzen auch bei Dosierungen auf, bei denen die Lokomotion noch völlig unbeeinflusst ist (vgl. **Publikation 3**, (Becker 2008)).

4.3.4 Katalapsie

Ein Hauptgrund für die hohe Rezidivrate bei Schizophrenie ist die nicht unerhebliche *Non-compliance* der Patienten, oft bedingt durch Nebenwirkungen, die die Lebensqualität einschränken (Masand 2006). Somit ist nicht nur die sehr gute Wirkung auf die Positivsymptomatik entscheidend für den Therapieerfolg, sondern auch eine möglichst geringe Ausprägung von Nebenwirkungen. Extrapyramidale Symptome (EPS) treten in 75% der mit klassischen Antipsychotika behandelten Patienten auf und gehören damit zu den häufigsten Nebenwirkungen von Neuroleptika (Casey 1991). Zudem gilt ein vermindertes Auftreten von EPS als Kriterium für den „atypischen“ Charakter eines Neuroleptikums. Daher wurden die im Stabsprung-Experiment getesteten Verbindungen auch in Katalapsie-Versuchen untersucht (Abbildung 4.3.2), welchen eine verlässliche Vorhersagekraft für das Auftreten von EPS zugeordnet wird (vgl. Kapitel 1.4.3). Analog der Vorgehensweise von *Kleven et al.* (1996) wurden alle Tiere zuerst dem *Bar-Test* und direkt im Anschluss dem *Cross-Leg-Test* unterzogen.

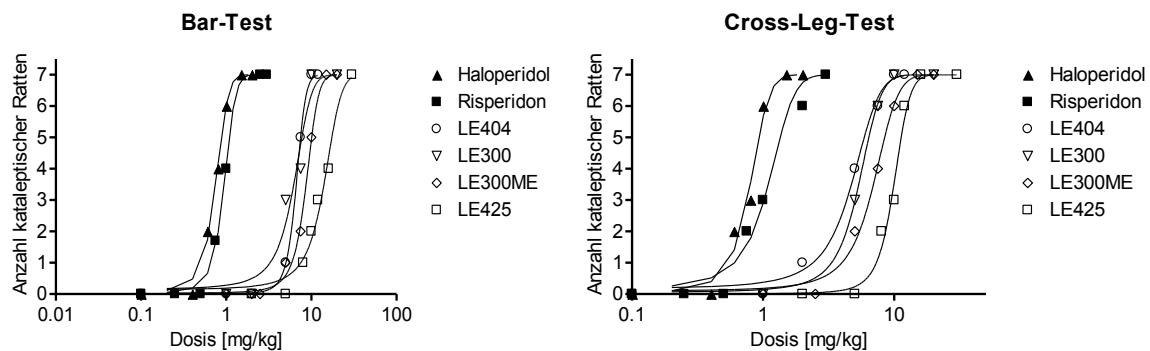


Abbildung 4.3.2 Dosis-Wirkungs-Kurven der Katalapsie-Tests

7 Ratten je Dosis, 30 Minuten nach Substanzgabe

Sowohl das klassische Neuroleptikum Haloperidol als auch das atypische Antipsychotikum Risperidon verursachten bereits bei geringen Dosen eine Katalapsie (ED_{50} (30 min) = 0,7 - 1,2 mg/kg), während die untersuchten [d,g]-Azecine mit ED_{50} -Werten zwischen 4,3 und 13,9 mg/kg 30 Minuten nach Substanzgabe erst bei deutlich höheren Dosen diese Nebenwirkung auslösten (Abbildung 4.3.2).

LE404 wies durch seine gute Wirkung im CAR-Test bei bereits sehr niedrigen Dosierungen, eine 5-fach größere therapeutische Breite hinsichtlich der Katalapsie als Haloperidol oder Risperidon auf. Auch LE300ME und LE300 zeigten Vorteile gegenüber den Referenz-Verbindungen im Nebenwirkungs-Wirkungs-Verhältnis (Tabelle 4.3.4).

Tabelle 4.3.4 Ergebnisse der Katalepsie-Versuche 30 Minuten nach Substanzgabe und die therapeutische Breite hinsichtlich des Auftretens einer Katalepsie (CAT/CAR)

Substanz	CAT (Bar)	CAT (Bar)	CAT (C-L)	CAT (C-L)	CAT/CAR [*]
	<i>ED</i> ₅₀ [mg/kg]	CI 95%	<i>ED</i> ₅₀ [mg/kg]	CI 95%	
LE404	6,5	5,8 - 7,4	4,3	3,8 - 4,8	13,4 - 20,3
LE300ME	8,3	7,9 - 9,2	6,2	4,4 - 8,0	8,7 - 11,7
LE300	8,8	7,6 - 10,2	7,2	6,2 - 8,3	7,7 - 9,4
LE425	13,9	12,9 - 15,0	9,8	9,1 - 10,6	3,9 - 5,5
Haloperidol	0,7	0,68 - 0,78	0,8	0,70 - 0,87	3,5 - 4,0
Risperidon	1,2	0,9 - 1,4	1,1	1,0 - 1,3	1,8 - 2,0

CAT Katalepsie, C-L Cross-Leg Test, CI Konfidenz-Intervall, *Werte für CAR siehe Tabelle 5.3.2, Berechnung für *ED*₅₀ CAT(BAR) und *ED*₅₀ CAT (C-L) dividiert durch *ED*₅₀ (CAR)

Es verwundert, dass Risperidon als atypisches Neuroleptikum in diesem Test nicht besser abschneidet als Haloperidol. Auch in klinischen Studien wurde bereits belegt, dass Risperidon – trotz der hohen 5-HT_{2A}-Affinität – bei klinisch titrierten Dosen keine Vorteile gegenüber Haloperidol bezüglich des Auftretens von EPS zeigt (Ceskova 1993). Der Vorteil von Serotonin-Antagonisten hinsichtlich dem Auftreten von parkinsonähnlichen Symptomen wird seitdem kontrovers diskutiert (Kapur 1996). Allerdings ist Risperidon klassischen Neuroleptika im Hinblick auf die Wirkung gegen die Negativsymptomatik deutlich überlegen, was hauptsächlich einer durch 5-HT_{2A}-Blockade hervorgerufenen Ausschüttung von Dopamin im PFC zugeschrieben wird (vgl. Kapitel 1.1.2).

Es ist demnach zu vermuten, dass die dargestellten Vorteile hinsichtlich der therapeutischen Breite im Bezug auf die Katalepsie nicht durch die hohe 5-HT_{2A}-Affinität der [*d,g*]-Azecine bedingt ist. Vielmehr haben die untersuchten [*d,g*]-Azecine das Potential, auch gegen die Negativsymptome der Schizophrenie wirksam zu sein, was in weiteren Tierexperimenten belegt werden sollte.

4.3.5 Korrelationen

Um die Vorhersagekraft von Radioligandbindungsstudien an Dopamin- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren für *in vivo*-Ergebnisse beurteilen zu können, wurden die *ED*₅₀-Werte aus den Tierversuchen gegen die *K_i*-Werte an den einzelnen Rezeptorsubtypen korreliert. Es konnte für keinen der Rezeptor-Subtypen eine signifikante lineare Abhängigkeit ($p < 0,05$) zur Reduzierung der lokomotorischen Aktivität, zur CAR-Inhibition oder dem Auftreten von Katalepsie festgestellt werden. Dies bestätigt die Hypothese, dass nicht die Blockade an einem Rezeptor-Subtyp allein, sondern nur die Wirkung an mehreren Rezeptor-Subtypen für die hier untersuchten *in vivo*-Wirkungen verantwortlich sein können (Kapur 1996; Richtand 2008).

Die besten, wenn auch nicht signifikanten Korrelationen ergaben sich zwischen D₂-Rezeptor-Affinität und lokomotorischer Aktivität ($r^2 = 0,7$; $p = 0,22$), D₄-Rezeptor-Affinität und CAR-Inhibition ($r^2 = 0,63$; $p = 0,59$) sowie D₂-Rezeptor-Affinität und dem Auftreten einer Katalepsie ($r^2 = 0,64$; $p = 0,16$). Letzteres ist nicht verwunderlich, da eine Katalepsie bei der Einnahme von Neuroleptika vorrangig durch eine zeitweilige Blockade der postsynaptischen nigrostriatalen D₂-Rezeptoren hervorgerufen wird (Vasconcelos 2003). Eine moderate Korrelation der D₂-Rezeptor-Blockade und der Inhibition der lokomotorischen Aktivität ist ebenfalls nicht überraschend, da die Einschränkung der lokomotorischen Aktivität, wie auch bereits von *Vasconcelos et al.* (2003) beschrieben, signifikant mit dem Auftreten einer Katalepsie korreliert ($r^2 = 0,89$; $p = 0,02$).

Erstaunlicher Weise zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen dem CAT/CAR-Verhältnis unter Verwendung der ED_{50} -Werte des *Cross-Leg-Tests* und der Blockade von D₁- ($r^2 = 0,95$; $p = 0,03$) und D₅-Rezeptoren ($r^2 = 0,96$; $p = 0,03$). Hingegen konnte die von *Balsara et al.* (1979) gefundene deutliche Korrelation zwischen 5-HT_{2A}-Rezeptor-Affinität und Katalepsie ($r^2 = 0,44$; $p = 0,54$) bzw. dem CAT/CAR-Verhältnis ($r^2 = 0,28$; $p = 0,86$) in unseren Experimenten nicht bestätigt werden. Ebenso wurde keine lineare Abhängigkeit zwischen dem von *Meltzer et al.* (2003) als essentiell für die atypische Wirkung postulierten Verhältnis von D₂- und 5-HT_{2A}-Affinität und den durchgeführten Tierversuchen festgestellt ($r^2 < 0,2$).

Bei dieser Betrachtung ist allerdings zu bedenken, dass es sich um eine sehr kleine Auswahl von Substanzen handelt. Für zuverlässige Korrelationsstudien und signifikante Werte ist es nötig, die Tierversuche auf eine größere Anzahl an Verbindungen auszuweiten.

Um den Einfluss von hier nicht betrachteten Serotonin-Rezeptor-Subtypen einschätzen zu können, wurden zudem die Leitsubstanzen LE300 und LE404 am *National Institute of Mental Health (NIMH 2010)* hinsichtlich ihrer Affinitäten zu anderen Rezeptoren überprüft. Die Bindungsdaten zu den für die Schizophrenie wichtigsten Serotonin-Rezeptoren sind in Tabelle 4.3.5 aufgeführt. Korrelationsstudien waren aufgrund der sehr begrenzten Anzahl von Testsubstanzen nicht möglich.

Tabelle 4.3.5 Affinitäten von LE300 und LE404 zu einigen Serotonin-Rezeptor-Subtypen

Substanz	K_i [nM]				
	5-HT _{1A}	5-HT _{2C}	5-HT ₃	5-HT ₆	5-HT ₇
LE300	590	22	2900	2,4	63
LE404	317	15	1613	1,6	7,2

Werte aus der PDSP Datenbank (NIMH 2010), Radioligand-Bindungsassay

Die 5-HT_{1A}- und 5-HT_{2C}-Rezeptor-Affinitäten von LE300 und LE404 sind nur gering und sollten daher keinen Einfluss auf die beobachteten *in vivo*-Ergebnisse haben. Hingegen binden die Substanzen mit hohen Affinitäten an 5-HT_{2C}-, 5-HT₆- und 5-HT₇-Rezeptoren. Wie in Kapitel 1.1.2

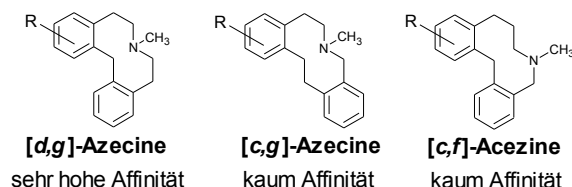
erläutert, ist die Funktion dieser drei Rezeptoren in der Pathophysiologie der Schizophrenie bisher nicht geklärt. Insbesondere dem 5-HT_{2C}-Rezeptor wird im Hinblick auf eine Beeinflussung der Positiv- und Negativsymptomatik eine große Bedeutung beigemessen (Kim 2009). Desweiteren könnte durch 5-HT₆-Rezeptor-Antagonisten eine Kognitionsverbesserung bewirkt werden (Meltzer 2003). Im Folgenden sollte daher auch die Funktionalität an diesen Rezeptoren bestimmt werden eventuell Tierversuche hinsichtlich einer möglichen Kognitionsverbesserung angeschlossen werden.

5 Zusammenfassung

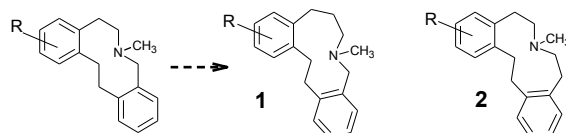
Neue Neuroleptika sollen sowohl gegen positive als auch gegen negative und kognitive Symptome der Schizophrenie wirksam sein und dabei möglichst wenige Nebenwirkungen verursachen. Vor diesem Hintergrund untersucht die vorliegende Arbeit, ob Hexahydrodibenz- und -benzindolazecine als potenziell atypische Neuroleptika geeignet wären. Hierbei standen die Analyse von Struktur-Wirkungsbeziehungen an Dopamin-Rezeptoren und Cholinesterasen sowie Tierversuche mit aussichtsreichen neuen Substanzen im Vordergrund.

38 neue Zielverbindungen, unter denen sich auch zwei neue heterozyklische Ringsysteme befinden, wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt und zunächst in einem Radioligand-bindungsassay und einem funktionellen Calciumassay an Dopamin-Rezeptoren bzw. in einem *Ellman*-Assay auf inhibitorische Potenz an Cholinesterasen getestet. Dadurch konnten die folgenden, neuen Erkenntnisse zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen gewonnen werden:

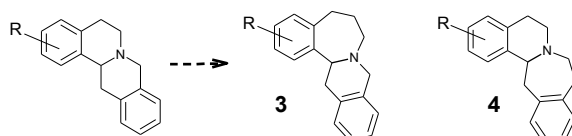
- Für die hohen Affinitäten der Hexahydrodibenzo[*d,g*]azecine an Dopamin-Rezeptoren ist das Annelierungsmuster und nicht die hohe Flexibilität dieser Verbindungen ausschlaggebend. Die Funktionalität an Dopamin-Rezeptoren scheint jedoch nicht durch das Annelierungs-, sondern ausschließlich durch das Substitutionsmuster beeinflusst zu sein.



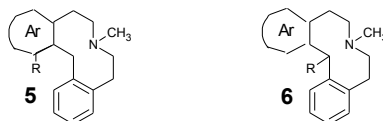
- Eine Ringerweiterung von Hexahydrodibenzo[*c,g*]azecinen zu 11-Ring-Homologen führt zu zwei Isomeren, die sich in ihren Affinitäten zu Dopamin-Rezeptoren stark unterscheiden. Eine Erweiterung zu Homologen mit Benzylamin-Substruktur (**1**) resultiert in dramatischen Affinitätsverlusten, während die 11-Ring-Homologe mit Bis-phenylethylamin-Substruktur (**2**) eine erhebliche Affinitätssteigerung im Vergleich zum [*c,g*]-Azecin aufweisen.



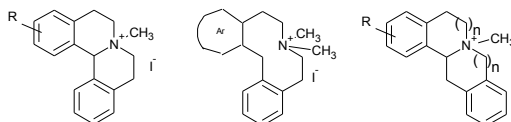
- Ringerweiterungen der Tetrahydrodibenzo[*c,g*]chinolizine führen ebenfalls zu zwei Isomeren (**3**, **4**) mit den oben erwähnten Affinitätsunterschieden. Hierbei weist die isomere Form mit stärker gewinkelter Konformation (**3**) eine deutliche D₄-Rezeptor-Selektivität auf.



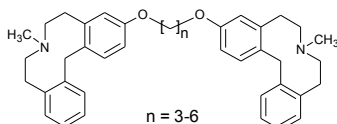
- Kleine Substituenten im Bereich zwischen den Aromaten der bisannelierten Hexahydro-[d,g]azecine (vgl. **5**, **6**) werden an D₁- und D₅-Rezeptoren sehr gut toleriert, während diese Substitutionen bei D₂-, D₃- und D₄-Rezeptoren zu teilweise drastischen Affinitätsverlusten führen. Mit Hilfe von *in silico*-Studien konnte durch die Einführung der Substituenten zwischen beiden Aromaten eine leichte Streckung des Moleküls nachgewiesen werden.



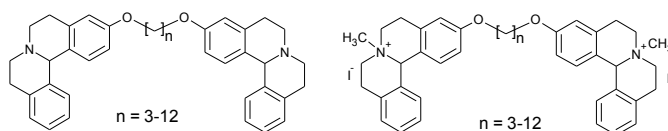
- Obwohl es als gesichert angenommen werden kann, dass der basische Stickstoff der Liganden in protonierter Form eine Salzbrücke zum Aspartat D3.32 an Dopamin-Rezeptor ausbildet, haben quartärnisierte Derivate mit dauerhafter Ladung (siehe unten) nahezu keine Affinität zu den Rezeptoren.



- Bivalente Hexahydrodibenzo[d,g]azecine sind sowohl hochaffine Liganden an Dopamin-Rezeptoren als auch potente Cholinesterase-Inhibitoren, was eine Beeinflussung der kognitiven Symptome der Schizophrenie ermöglichen könnte. Beide Effekte sind stark von der Kettenlänge und der Art der Verknüpfung abhängig.

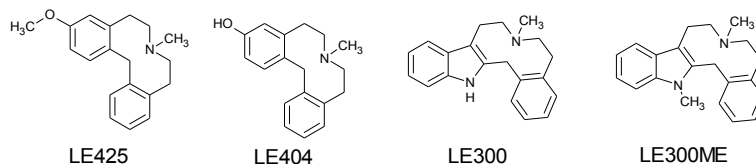


- Bivalente Tetrahydrodibenzo[d,g]chinolizin und -chinolizinium-Derivate zeigen ebenso eine kettenlängenabhängige hohe Inhibition der Acetyl- und Butyrylcholinesterase, während die monomeren Verbindungen kaum Aktivitäten aufweisen. Eine deutliche Butyrylcholinesterase-Selektivität konnte für die hinsichtlich der Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit vorteilhafteren ungeladenen Verbindungen nachgewiesen werden.



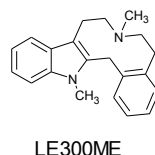
Erste Tierversuche mit je einem bivalenten Tetrahydrodibenzo[d,g]chinolizin (n = 6) und Hexahydrodibenzo[d,g]azecin (n = 3) zeigten vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich der Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit dieser Substanzen.

In Vorbereitung der *in vivo*-Versuche wurde zudem die Toxizität einiger entwickelter Substanzen auf menschliche Gehirnzellen bestimmt. Während die Leitstrukturen der Hexahydrodibenzo- und -benzindolo[*d,g*]azecine (LE300, LE404, LE425) keinerlei Toxizität bis 250 μ M zeigten, führten Veränderungen am Grundgerüst sowie zusätzliche Substituenten am Indol-*N* des LE300 oder Bivalenz zu erheblichen Zytotoxizitätssteigerungen.



In Tierversuchen an Ratten wurden vier bisannelierte Hexahydro[*d,g*]azecine (siehe oben) mit den Standardwirkstoffen Haloperidol und Risperidon verglichen. Alle getesteten Substanzen zeigten im Stabsprung-Experiment, das mit diesem Projekt im Institut etabliert wurde, eine hohe neuroleptische Potenz hinsichtlich der Positivsymptomatik der Schizophrenie. Das Hervorrufen von extrapyramidalen Nebenwirkungen wurde mit Hilfe des Katalepsiemodells bestimmt. Dabei zeigten sich deutliche Vorteile der Testverbindungen gegenüber den Standardwirkstoffen hinsichtlich des Wirkungs-Nebenwirkungs-Verhältnisses.

Auch erste Versuche zur oralen Bioverfügbarkeit lieferten insbesondere für die Verbindung LE300ME gute Ergebnisse. Diese Substanz zeigte somit in allen durchgeführten Versuchen vielversprechende pharmakologische Eigenschaften in Bezug auf die Entwicklung eines modernen Neuroleptikums.



Die durchgeführten Korrelationsstudien lassen darauf schließen, dass die *in vivo*-Ergebnisse auf Wirkungen an mehreren Rezeptoren beruhen. Dabei scheinen die hohen D_1 - und D_5 -Affinitäten der Hexahydrodibenzo- und -benzindolo[*d,g*]azecine einen positiven Einfluss auf die therapeutische Breite hinsichtlich extrapyramidalen Symptome zu haben.

Insgesamt konnte durch diese Arbeit erstmals die Eignung der bisannelierten Hexahydro[*d,g*]azecine als potenzielle atypische Neuroleptika *in vivo* bestätigt werden. Zudem wurden wichtige neue Struktur-Wirkungs-Beziehungen an Dopamin-Rezeptoren aufgedeckt und somit ein Beitrag zur weiteren Strukturoptimierung dieser vielversprechenden Substanzklasse geleistet. Besonders wesentlich erscheint zudem der neue Ansatz einer dualen Wirkung an Dopamin-Rezeptoren und Cholinesterasen für eine bessere Wirkung hinsichtlich kognitiver Symptome.

6 Conclusion

Novel neuroleptic compounds should act likewise against positive, negative and cognitive symptoms, while causing least possible side effects. In the present work, hexahydrodibenz- and benzindoloazecines were investigated on their potential to meet these requirements. Therefore, analysis of structure-activity-relationships at dopamine receptors and cholinesterases with novel synthesized substances as well as *in vivo* studies with promising compounds were performed.

38 target compounds, inclusive two novel heterocyclic ring systems have been synthesized. All these compounds were either tested in a radioligand binding and a functional calcium assay at dopamine receptors or in an *Ellman* assay at cholinesterases. Thereby structure-activity relationships could be observed as follows:

- The high affinities of [*d,g*]-azecines at dopamine receptors are bound to the annelation pattern, while functionalities at the receptors seem to be dependent on the substitutions of the aromatics.
- Ring-expansion of [*c,g*]-azecines revealed two isomers, with distinct differences in their receptor binding to dopamine receptors. While ring expansion to the homologue with benzyl amine substructure led to dramatic decrease of affinities, the other homolog showed even higher affinities compared to [*c,g*]-azecines. The same relation could be found for the underlying tetracyclic compounds. The tetracyclic isomer with higher affinities revealed a distinct selectivity to D₄ receptors.
- Small substituents between the two aromatic moieties of [*d,g*]-azecines led to a dramatic decrease in affinities at D₂, D₃ and D₄ receptors, while D₁ and D₅ receptors were mostly not influenced. Using *in silico* studies a slightly less flexed conformation of the compounds with additional substituents could be observed.
- Compounds with permanent charge at the nitrogen do not reveal significant affinities to dopamine receptors, though it is widely accepted that the basic nitrogen of dopamine receptor ligands binds in its protonated state at aspartate D3.32 of the receptors.
- Bivalent [*d,g*]-azecines are both dopamine receptor antagonists and cholinesterase inhibitors. This could be useful in treating the cognitive symptoms of schizophrenia. Both effects of the compounds are dependent on spacer length and on the atom used for the linkage.

- Bivalent tetrahydrodibenzochinolizine derivatives and -chinolizinium salts also displayed spacer length dependent high inhibitory activities in the nanomolar range, which were much higher than for the monomer congeners. A distinct selectivity towards butyrylcholinesterase could be observed for the uncharged, and perhaps therefore better blood-brain-barrier penetrable derivatives.

First *in vivo* studies on a bivalent hexahydrodibenzazecine- and a bivalent tetrahydrodibenzochinolizine-derivative revealed promising results regarding the ability to pass the blood brain barrier.

Prior to the *in vivo* investigations, the cytotoxicity of several compounds on human brain cells was estimated. While the lead compounds of the [*d,g*]-azecines showed no toxic effects up to 250 μ M, changes of the scaffold, but also substituents at the indole-*N* of LE300 or bivalence led to a considerable increase of cytotoxicity.

In vivo experiments with rats on four examples of [*d,g*]-azecines were performed. In a pole jump experiment all tested compounds revealed neuroleptic activities. LE404 and LE300ME showed to be equally potent in this model like haloperidol and risperidone, while causing much less catalepsy, which is considered to be a predictive model for extrapyramidal side effects.

Preliminary tests for oral bioavailability displayed especially for compound LE300ME promising results. Suspecting efficacy on negative symptoms through the high 5-HT_{2A} receptor affinity, this compound seem to fulfil all requirements on a modern neuroleptic substance.

Correlation analysis pointed to an involvement of several receptors on the *in vivo* effects. Nevertheless, high D₁ and D₂ receptor affinities, owned by most of the [*d,g*]-azecines, seem to have a positive influence on the therapeutic range regarding neuroleptic potency and extrapyramidal side effects *in vivo*.

Conclusively it was shown in this work for the first time, that [*d,g*]azecines can act as potent neuroleptic compounds *in vivo*. Besides, several structure-activity relationships could be identified and may serve for further structure optimization of this promising class of compounds.

7 Literaturverzeichnis

- Abadi, A.H., Lankow, S., Hoefgen, B., Decker, M., Kassack, M.U., Lehmann, J. "Dopamine/serotonin receptor ligands, part III [1]: synthesis and biological activities of 7, 7'-alkylene-bis-6, 7, 8, 9, 14, 15-hexahydro-5H-benz[d]indolo[2, 3-g]azecines -- application of the bivalent ligand approach to a novel type of dopamine receptor antagonist." *Arch Pharm (Weinheim)* **2002**, 335 (8): 367.
- Abi-Dargham, A., Gil, R., Krystal, J., et al. "Increased striatal dopamine transmission in schizophrenia: confirmation in a second cohort." *Am J Psychiatry* **1998**, 155 (6): 761.
- Abi-Dargham, A., Rodenhiser, J., Printz, D., et al. "Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, 97 (14): 8104.
- Abi-Dargham, A. "Do we still believe in the dopamine hypothesis? New data bring new evidence." *Int J Neuropsychopharmacol* **2004**, 7 Suppl 1: S1.
- Adler, L.E., Hoffer, L.D., Wiser, A., Freedman, R. "Normalization of auditory physiology by cigarette smoking in schizophrenic patients." *Am J Psychiatry* **1993**, 150 (12): 1856.
- Agid, O., Mamo, D., Ginovart, N., Vitcu, I., Wilson, A.A., Zipursky, R.B., Kapur, S. "Striatal vs extrastriatal dopamine D2 receptors in antipsychotic response--a double-blind PET study in schizophrenia." *Neuropsychopharmacology* **2007**, 32 (6): 1209.
- Alex, K.D., Pehek, E.A. "Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission." *Pharmacol Ther* **2007**, 113 (2): 296.
- Altar, C.A., Wasley, A.M., Neale, R.F., Stone, G.A. "Typical and atypical antipsychotic occupancy of D2 and S2 receptors: an autoradiographic analysis in rat brain." *Brain Res Bull* **1986**, 16 (4): 517.
- Alvir, J.M., Lieberman, J.A., Safferman, A.Z., Schwimmer, J.L., Schaaf, J.A. "Clozapine-induced agranulocytosis. Incidence and risk factors in the United States." *N Engl J Med* **1993**, 329 (3): 162.
- Andersson, J.L., Nomikos, G.G., Marcus, M., Hertel, P., Mathe, J.M., Svensson, T.H. "Ritanserin potentiates the stimulatory effects of raclopride on neuronal activity and dopamine release selectivity in the mesolimbic dopaminergic system." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **1995**, 352 (4): 374.
- Andujar, S.A., de Angel, B.M., Charris, J.E., et al. "Synthesis, dopaminergic profile, and molecular dynamics calculations of N-alkyl substituted 2-aminoindans." *Bioorg Med Chem* **2008**, 16 (6): 3233.
- Anisman, H., Merali, Z. "Rodent models of depression: learned helplessness induced in mice." *Curr Protoc Neurosci* **2001**, Chapter 8: Unit 8 10C.
- Balsara, J.J., Jadhav, J.H., Chandorkar, A.G. "Effect of drugs influencing central serotonergic mechanisms on haloperidol-induced catalepsy." *Psychopharmacology (Berl)* **1979**, 62 (1): 67.
- Bangen, H.C. Geschichte der medikamentösen Therapie der Schizophrenie. **1992**, Berlin, VWB Vlg. F. Wissenschaft.
- Becker, A., Grecksch, G. "Haloperidol and clozapine affect social behaviour in rats postnatally lesioned in the ventral hippocampus." *Pharmacol Biochem Behav* **2003**, 76 (1): 1.
- Becker, A., Grecksch, G. "Ketamine-induced changes in rat behaviour: a possible animal model of schizophrenia. Test of predictive validity." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **2004**, 28 (8): 1267.
- Becker, A., Grecksch, G. "Phosphodiesterase inhibitors--are they potential neuroleptic drugs?" *Behav Brain Res* **2008**, 186 (2): 155.
- Benedetti-Doctorovich, V., Huang, F.Y., Lambropoulos, J., Burgess, E.M., Zalkow, L.H. "New N-Substituted (±)-Dehydronorglaucine Analogs." *Synthetic Communications* **1995**, 25 (22): 3701.
- Breese, C.R., Lee, M.J., Adams, C.E., et al. "Abnormal regulation of high affinity nicotinic receptors in subjects with schizophrenia." *Neuropsychopharmacology* **2000**, 23 (4): 351.
- Buchsbaum, M.S., Ingvar, D.H., Kessler, R., et al. "Cerebral glucography with positron tomography. Use in normal subjects and in patients with schizophrenia." *Arch Gen Psychiatry* **1982**, 39 (3): 251.

- Burris, K.D., Molski, T.F., Xu, C., et al. "Aripiprazole, a novel antipsychotic, is a high-affinity partial agonist at human dopamine D2 receptors." *J Pharmacol Exp Ther* **2002**, 302 (1): 381.
- Carlsson, A. "The neurochemical circuitry of schizophrenia." *Pharmacopsychiatry* **2006**, 39 Suppl 1: S10.
- Casey, D.E. "Neuroleptic drug-induced extrapyramidal syndromes and tardive dyskinesia." *Schizophr Res* **1991**, 4 (2): 109.
- Casey, D.E. "Behavioral effects of sertindole, risperidone, clozapine and haloperidol in Cebus monkeys." *Psychopharmacology (Berl)* **1996**, 124 (1-2): 134.
- Ceskova, E., Svestka, J. "Double-blind comparison of risperidone and haloperidol in schizophrenic and schizoaffective psychoses." *Pharmacopsychiatry* **1993**, 26 (4): 121.
- Charych, E.I., Liu, F., Moss, S.J., Brandon, N.J. "GABA(A) receptors and their associated proteins: implications in the etiology and treatment of schizophrenia and related disorders." *Neuropharmacology* **2009**, 57 (5-6): 481.
- Creese, I., Burt, D.R., Snyder, S.H. "Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs." *Science* **1976**, 192 (4238): 481.
- Crocker, A.D. "Dopamine-mechanism of action." *Aust Prescr* **1994**, 17: 17.
- Davies, M.F., Deisz, R.A., Prince, D.A., Peroutka, S.J. "Two distinct effects of 5-hydroxytryptamine on single cortical neurons." *Brain Res* **1987**, 423 (1-2): 347.
- Davis, A.S., Jenner, P., Marsden, C.D. "A comparison of motor behaviours in groups of rats distinguished by their climbing response to apomorphine." *Br J Pharmacol* **1986**, 87 (1): 129.
- Davis, K.L., Kahn, R.S., Ko, G., Davidson, M. "Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization." *Am J Psychiatry* **1991**, 148 (11): 1474.
- Dawe, G.S., Hwang, E.H., Tan, C.H. "Pathophysiology and animal models of schizophrenia." *Ann Acad Med Singapore* **2009**, 38 (5): 425.
- de Almeida, J., Palacios, J.M., Mengod, G. "Distribution of 5-HT and DA receptors in primate prefrontal cortex: implications for pathophysiology and treatment." *Prog Brain Res* **2008**, 172: 101.
- de Oliveira, L., Cunha, A.O., Mortari, M.R., Coimbra, N.C., Dos Santos, W.F. "Cataleptic activity of the denatured venom of the social wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae) in *Rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae)." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **2006**, 30 (2): 198.
- Decker, M., Schleifer, K.J., Nieger, M., Lehmann, J. "Dopamine/serotonin receptor ligands. Part VIII: the dopamine receptor antagonist LE300 - modelled and X-ray structure plus further pharmacological characterization, including serotonin receptor binding, biogenic amine transporter testing and in vivo testings." *Eur J Med Chem* **2004**, 39 (6): 481.
- Decker, M., Lehmann, J. "LE300--new results on its ability to antagonize the discriminative stimulus effects of cocaine." *Pharmazie* **2006**, 61 (3): 248.
- Decker, M., Lehmann, J. "Agonistic and antagonistic bivalent ligands for serotonin and dopamine receptors including their transporters." *Curr Top Med Chem* **2007**, 7 (4): 347.
- Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie, P.u.N. Behandlungsleitlinie Schizophrenie. *S3-Praxisleitlinien in Psychiatrie und Psychotherapie*. **2006**, Gaebel, W., Falkai, P., Springer Verlag.
- Di Giovanni, G., Di Matteo, V., Esposito, E. "Alterations of dopamine and serotonin transmission in schizophrenia." *Prog Brain Res* **2008**, 172: 117.
- Dickey, C.C., McCarley, R.W., Shenton, M.E. "The brain in schizotypal personality disorder: a review of structural MRI and CT findings." *Harv Rev Psychiatry* **2002**, 10 (1): 1.
- Drinkenburg, W.H.I.M., Vijn, P., Martorana, M.G., Dickson, M., van Schaijk, W. A novel automated apomorphine climbing test. *Measuring Behavior 2000* **2000**, Nijmegen, Niederlande.
- Du, D.M., Carlier, P.R. "Development of bivalent acetylcholinesterase inhibitors as potential therapeutic drugs for Alzheimer's disease." *Curr Pharm Des* **2004**, 10 (25): 3141.

- Ellenbroek, B.A., Peeters, B.W., Honig, W.M., Cools, A.R. "The paw test: a behavioural paradigm for differentiating between classical and atypical neuroleptic drugs." *Psychopharmacology (Berl)* **1987**, 93 (3): 343.
- Ellenbroek, B.A., Cools, A.R. "Animal models with construct validity for schizophrenia." *Behav Pharmacol* **1990**, 1 (6): 469.
- Ellenbroek, B.A. "Treatment of schizophrenia: a clinical and preclinical evaluation of neuroleptic drugs." *Pharmacol Ther* **1993**, 57 (1): 1.
- Ellenbroek, B.A., Lubbers, L.J., Cools, A.R. "Activity of "seroquel" (ICI 204,636) in animal models for atypical properties of antipsychotics: a comparison with clozapine." *Neuropsychopharmacology* **1996**, 15 (4): 406.
- Ellenbroek, B.A., Cools, A.R. "Animal models for the negative symptoms of schizophrenia." *Behav Pharmacol* **2000**, 11 (3-4): 223.
- Enzensperger, C., Lehmann, J. "Dopamine/serotonin receptor ligands. 13: Homologization of a benzindoloazecine-type dopamine receptor antagonist modulates the affinities for dopamine D(1)-D(5) receptors." *J Med Chem* **2006**, 49 (21): 6408.
- Enzensperger, C., Kilian, S., Ackermann, M., Koch, A., Kelch, K., Lehmann, J. "Dopamine/serotonin receptor ligands. Part 15: Oxygenation of the benz-indolo-azecine LE 300 leads to novel subnanomolar dopamine D1/D5 antagonists." *Bioorg Med Chem Lett* **2007a**, 17 (5): 1399.
- Enzensperger, C., Muller, F.K., Schmalwasser, B., Wiecha, P., Traber, H., Lehmann, J. "Dopamine/serotonin receptor ligands. 16.(1) Expanding dibenz[d,g]azecines to 11- and 12-membered homologues. Interaction with dopamine D(1)-D(5) receptors." *J Med Chem* **2007b**, 50 (18): 4528.
- Enzensperger, C., Gornemann, T., Pertz, H.H., Lehmann, J. "Dopamine/serotonin receptor ligands. Part 17: a cross-target SAR approach: affinities of azecine-styled ligands for 5-HT(2A) versus D1 and D2 receptors." *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, 18 (13): 3809.
- Fang, L., Appenroth, D., Decker, M., et al. "NO-donating tacrine hybrid compounds improve scopolamine-induced cognition impairment and show less hepatotoxicity." *J Med Chem* **2008**, 51 (24): 7666.
- Farde, L., Nordstrom, A.L. "PET analysis indicates atypical central dopamine receptor occupancy in clozapine-treated patients." *Br J Psychiatry Suppl* **1992**, (17): 30.
- Feldon, J., Weiner, I. "From an animal model of an attentional deficit towards new insights into the pathophysiology of schizophrenia." *J Psychiatr Res* **1992**, 26 (4): 345.
- Freedman, R., Olincy, A., Buchanan, R.W., et al. "Initial phase 2 trial of a nicotinic agonist in schizophrenia." *Am J Psychiatry* **2008**, 165 (8): 1040.
- Gaspar, P.A., Bustamante, M.L., Silva, H., Aboitiz, F. "Molecular mechanisms underlying glutamatergic dysfunction in schizophrenia: therapeutic implications." *J Neurochem* **2009**, 111 (4): 891.
- George, S.R., O'Dowd, B.F., Lee, S.P. "G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery." *Nat Rev Drug Discov* **2002**, 1 (10): 808.
- Geyer, M.A., Ellenbroek, B. "Animal behavior models of the mechanisms underlying antipsychotic atypicality." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **2003**, 27 (7): 1071.
- Giacobini, E. "Cholinergic function and Alzheimer's disease." *Int J Geriatr Psychiatry* **2003**, 18 (Suppl 1): S1.
- Girault, J.A., Greengard, P. "The neurobiology of dopamine signaling." *Arch Neurol* **2004**, 61 (5): 641.
- Gleason, S.D., Shannon, H.E. "Blockade of phencyclidine-induced hyperlocomotion by olanzapine, clozapine and serotonin receptor subtype selective antagonists in mice." *Psychopharmacology (Berl)* **1997**, 129 (1): 79.
- Greig, N.H., Utsuki, T., Ingram, D.K., et al. "Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer beta-amyloid peptide in rodent." *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, 102 (47): 17213.
- Haddad, P.M., Sharma, S.G. "Adverse effects of atypical antipsychotics : differential risk and clinical implications." *CNS Drugs* **2007**, 21 (11): 911.

- Hamacher, A., Weigt, M., Wiese, M., Hoefgen, B., Lehmann, J., Kassack, M.U. "Dibenzazecine compounds with a novel dopamine/5HT_{2A} receptor profile and 3D-QSAR analysis." *BMC Pharmacol* **2006**, 6: 11.
- Heinrichs, R.W., Zakzanis, K.K. "Neurocognitive deficit in schizophrenia: a quantitative review of the evidence." *Neuropsychology* **1998**, 12 (3): 426.
- Heinz, A., Knable, M.B., Weinberger, D.R. "Dopamine D₂ receptor imaging and neuroleptic drug response." *J Clin Psychiatry* **1996**, 57 Suppl 11: 84.
- Henn, F.A., Braus, D.F. "Structural neuroimaging in schizophrenia. An integrative view of neuromorphology." *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **1999**, 249 Suppl 4: 48.
- Hersi, A.I., Kitaichi, K., Srivastava, L.K., Gaudreau, P., Quirion, R. "Dopamine D-5 receptor modulates hippocampal acetylcholine release." *Brain Res Mol Brain Res* **2000**, 76 (2): 336.
- Hill, S.K., Bishop, J.R., Palumbo, D., Sweeney, J.A. "Effect of second-generation antipsychotics on cognition: current issues and future challenges." *Expert Rev Neurother* **2010**, 10 (1): 43.
- Hoefgen, B., Decker, M., Mohr, P., et al. "Dopamine/serotonin receptor ligands. 10: SAR Studies on azecine-type dopamine receptor ligands by functional screening at human cloned D₁, D_{2L}, and D₅ receptors with a microplate reader based calcium assay lead to a novel potent D₁/D₅ selective antagonist." *J Med Chem* **2006**, 49 (2): 760.
- Holzgrabe, U., Kapkova, P., Alptuzun, V., Scheiber, J., Kugelmann, E. "Targeting acetylcholinesterase to treat neurodegeneration." *Expert Opin Ther Targets* **2007**, 11 (2): 161.
- Horacek, J., Bubenikova-Valesova, V., Kopecek, M., Palenicek, T., Dockery, C., Mohr, P., Hoschl, C. "Mechanism of action of atypical antipsychotic drugs and the neurobiology of schizophrenia." *CNS Drugs* **2006**, 20 (5): 389.
- Howes, O.D., Kapur, S. "The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III--the final common pathway." *Schizophr Bull* **2009**, 35 (3): 549.
- Hughes, J.R., Hatsukami, D.K., Mitchell, J.E., Dahlgren, L.A. "Prevalence of smoking among psychiatric outpatients." *Am J Psychiatry* **1986**, 143 (8): 993.
- Ichikawa, J., Meltzer, H.Y. "Relationship between dopaminergic and serotonergic neuronal activity in the frontal cortex and the action of typical and atypical antipsychotic drugs." *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **1999**, 249 Suppl 4: 90.
- Ichikawa, J., Ishii, H., Bonaccorso, S., Fowler, W.L., O'Laughlin, I.A., Meltzer, H.Y. "5-HT_{2A} and D₂ receptor blockade increases cortical DA release via 5-HT_{1A} receptor activation: a possible mechanism of atypical antipsychotic-induced cortical dopamine release." *J Neurochem* **2001**, 76 (5): 1521.
- Jin, G.Z., Zhu, Z.T., Fu, Y. "(-)-Stepholidine: a potential novel antipsychotic drug with dual D₁ receptor agonist and D₂ receptor antagonist actions." *Trends Pharmacol Sci* **2002**, 23 (1): 4.
- Jones, C.A., McCreary, A.C. "Serotonergic approaches in the development of novel antipsychotics." *Neuropharmacology* **2008**, 55 (6): 1056.
- Jorgensen, H.A., Andreassen, O.A., Hole, K. "The relationship between motor effects in rats following acute and chronic haloperidol treatment." *Psychopharmacology (Berl)* **1994**, 116 (1): 89.
- Kalani, M.Y., Vaidehi, N., Hall, S.E., et al. "The predicted 3D structure of the human D₂ dopamine receptor and the binding site and binding affinities for agonists and antagonists." *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, 101 (11): 3815.
- Kapur, S. "5-HT₂ antagonism and EPS benefits: is there a causal connection?" *Psychopharmacology (Berl)* **1996**, 124 (1-2): 35.
- Kapur, S., Seeman, P. "Does fast dissociation from the dopamine d(2) receptor explain the action of atypical antipsychotics?: A new hypothesis." *Am J Psychiatry* **2001**, 158 (3): 360.
- Kapur, S. "Psychosis as a state of aberrant salience: a framework linking biology, phenomenology, and pharmacology in schizophrenia." *Am J Psychiatry* **2003**, 160 (1): 13.

- Kassack, M.U., Hofgen, B., Decker, M., Eckstein, N., Lehmann, J. "Pharmacological characterization of the benz[d]indolo[2,3-g]azecine LE300, a novel type of a nanomolar dopamine receptor antagonist." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **2002**, 366 (6): 543.
- Kendler, K.S., Diehl, S.R. "The genetics of schizophrenia: a current, genetic-epidemiologic perspective." *Schizophr Bull* **1993**, 19 (2): 261.
- Kim, D.H., Maneen, M.J., Stahl, S.M. "Building a better antipsychotic: receptor targets for the treatment of multiple symptom dimensions of schizophrenia." *Neurotherapeutics* **2009**, 6 (1): 78.
- Klemm, W.R. "Behavioral arrest: in search of the neural control system." *Prog Neurobiol* **2001**, 65 (5): 453.
- Kleven, M., Prinssen, E.P., Koek, W. "Role of 5-HT_{1A} receptors in the ability of mixed 5-HT_{1A} receptor agonist/dopamine D₂ receptor antagonists to inhibit methylphenidate-induced behaviors in rats." *Eur J Pharmacol* **1996**, 313 (1-2): 25.
- Lang, U.E., Puls, I., Muller, D.J., Strutz-Seebohm, N., Gallinat, J. "Molecular mechanisms of schizophrenia." *Cell Physiol Biochem* **2007**, 20 (6): 687.
- Lanzenberger, R., Kasper, S. "[Neuroimaging in schizophrenia]." *Fortschr Neurol Psychiatr* **2005**, 73 Suppl 1: S51.
- Lehmann, J., Jiang, N., Behncke, A. "[Indoles. 9. 4-Arylated tetrahydro-beta-carbolines--synthesis and first pharmacologic data]." *Arch Pharm (Weinheim)* **1993**, 326 (10): 813.
- Levis, D.J., Dubin, W.J. "Some parameters affecting shuttle-box avoidance responding with rats receiving serially presented conditioned stimuli." *J Comp Physiol Psychol* **1973**, 82 (2): 328.
- Lindstrom, L.H., Gefvert, O., Hagberg, G., Lundberg, T., Bergstrom, M., Hartvig, P., Langstrom, B. "Increased dopamine synthesis rate in medial prefrontal cortex and striatum in schizophrenia indicated by L-(beta-11C) DOPA and PET." *Biol Psychiatry* **1999**, 46 (5): 681.
- Lisman, J.E., Coyle, J.T., Green, R.W., Javitt, D.C., Benes, F.M., Heckers, S., Grace, A.A. "Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia." *Trends Neurosci* **2008**, 31 (5): 234.
- Lovenberg, T.W., Brewster, W.K., Mottola, D.M., et al. "Dihydrexidine, a novel selective high potency full dopamine D-1 receptor agonist." *Eur J Pharmacol* **1989**, 166 (1): 111.
- Maier, W., Lichtermann, D., Rietschel, M., Held, T., Falkai, P., Wagner, M., Schwab, S. "[Genetics of schizophrenic disorders. New concepts and findings]." *Nervenarzt* **1999**, 70 (11): 955.
- Mansour, A., Meng, F., Meador-Woodruff, J.H., Taylor, L.P., Civelli, O., Akil, H. "Site-directed mutagenesis of the human dopamine D₂ receptor." *Eur J Pharmacol* **1992**, 227 (2): 205.
- Masand, P.S., Narasimhan, M. "Improving adherence to antipsychotic pharmacotherapy." *Curr Clin Pharmacol* **2006**, 1 (1): 47.
- McCarley, R.W., Wible, C.G., Frumin, M., Hirayasu, Y., Levitt, J.J., Fischer, I.A., Shenton, M.E. "MRI anatomy of schizophrenia." *Biol Psychiatry* **1999**, 45 (9): 1099.
- Meisenzahl, E.M., Schmitt, G.J., Scheuerecker, J., Moller, H.J. "The role of dopamine for the pathophysiology of schizophrenia." *Int Rev Psychiatry* **2007**, 19 (4): 337.
- Meltzer, H.Y., Bastani, B., Ramirez, L., Matsubara, S. "Clozapine: new research on efficacy and mechanism of action." *Eur Arch Psychiatry Neurol Sci* **1989a**, 238 (5-6): 332.
- Meltzer, H.Y., Matsubara, S., Lee, J.C. "Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D-1, D-2 and serotonin₂ pK_i values." *J Pharmacol Exp Ther* **1989b**, 251 (1): 238.
- Meltzer, H.Y., Nash, J.F. "Effects of antipsychotic drugs on serotonin receptors." *Pharmacol Rev* **1991**, 43 (4): 587.
- Meltzer, H.Y., Li, Z., Kaneda, Y., Ichikawa, J. "Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **2003**, 27 (7): 1159.
- Meltzer, H.Y. "What's atypical about atypical antipsychotic drugs?" *Curr Opin Pharmacol* **2004**, 4 (1): 53.
- Messer, W.S., Jr. "Bivalent ligands for G protein-coupled receptors." *Curr Pharm Des* **2004**, 10 (17): 2015.

- Micheli, F., Heidbreder, C. "Selective dopamine D3 receptor antagonists: a review 2001-2005." *Recent Pat CNS Drug Discov* **2006**, 1 (3): 271.
- Migler, B.M., Warawa, E.J., Malick, J.B. "Seroquel: behavioral effects in conventional and novel tests for atypical antipsychotic drug." *Psychopharmacology (Berl)* **1993**, 112 (2-3): 299.
- Millan, M.J., Dekeyne, A., Gobert, A. "Serotonin (5-HT)_{2C} receptors tonically inhibit dopamine (DA) and noradrenaline (NA), but not 5-HT, release in the frontal cortex in vivo." *Neuropharmacology* **1998**, 37 (7): 953.
- Mohr, P. "Neue Dibenz[d,g]azecine als hochaffine Liganden an humanen Dopaminrezeptoren". *Dissertation* **2005**, Friedrich-Schiller-Universität, Jena.
- Mohr, P., Decker, M., Enzensperger, C., Lehmann, J. "Dopamine/serotonin receptor ligands. 12(1): SAR studies on hexahydro-dibenz[d,g]azecines lead to 4-chloro-7-methyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenz[d,g]azecin-3-ol, the first picomolar D5-selective dopamine-receptor antagonist." *J Med Chem* **2006**, 49 (6): 2110.
- Munkvad, I., Pakkenberg, H., Randrup, A. "Aminergic systems in basal ganglia associated with stereotyped hyperactive behaviour and catalepsy." *Brain Behaviour Evolution* **1968**, 1: 89.
- NIMH Psychoactive Drug Screening Programm (PDSP) **2010**. <http://pdsp.med.unc.edu/>
- Nordstrom, A.L., Farde, L., Halldin, C. "Time course of D2-dopamine receptor occupancy examined by PET after single oral doses of haloperidol." *Psychopharmacology (Berl)* **1992**, 106 (4): 433.
- Pajouhesh, H., Lenz, G.R. "Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs." *NeuroRx* **2005**, 2 (4): 541.
- Pani, L., Gessa, G.L. "The substituted benzamides and their clinical potential on dysthymia and on the negative symptoms of schizophrenia." *Mol Psychiatry* **2002**, 7 (3): 247.
- Pearlson, G.D., Marsh, L. "Structural brain imaging in schizophrenia: a selective review." *Biol Psychiatry* **1999**, 46 (5): 627.
- Peng, X., Neumeyer, J.L. "Kappa receptor bivalent ligands." *Curr Top Med Chem* **2007**, 7 (4): 363.
- Perry, T.L., Kish, S.J., Buchanan, J., Hansen, S. "Gamma-aminobutyric-acid deficiency in brain of schizophrenic patients." *Lancet* **1979**, 1 (8110): 237.
- Protais, P., Costentin, J., Schwartz, J.C. "Climbing behavior induced by apomorphine in mice: a simple test for the study of dopamine receptors in striatum." *Psychopharmacology (Berl)* **1976**, 50 (1): 1.
- Pugsley, T.A., Shih, Y.H., Whetzel, S.Z., et al. "The discovery of PD 89211 and related compounds: selective dopamine D4 receptor antagonists." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **2002**, 26 (2): 219.
- Richtand, N.M., Welge, J.A., Logue, A.D., Keck, P.E., Jr., Strakowski, S.M., McNamara, R.K. "Role of serotonin and dopamine receptor binding in antipsychotic efficacy." *Prog Brain Res* **2008**, 172: 155.
- Robaa, D. "Novel Benzindoloazecines and Dibenzazecines - Synthesis and Dopamine Rezeptor Affinities". *Dissertation in Vorbereitung* **2010a**, Friedrich-Schiller-Universität, Jena.
- Robaa, D., Kretschmer, R., Siol, O., AbulAzm, S.E., ElKhawass, E., Lehmann, J., Enzensperger, C. "N14-Substitution of the Dopamine Antagonist LE300 Modulates Affinities and Selectivities for Dopamine D₁ - D₅ Rezeptors." *Arch Pharm (Weinheim)* **2010b**, submitted.
- Sams-Dodd, F. "A test of the predictive validity of animal models of schizophrenia based on phencyclidine and D-amphetamine." *Neuropsychopharmacology* **1998**, 18 (4): 293.
- Scatton, B., Worms, P., Lloyd, K.G., Bartholini, G. "Cortical modulation of striatal function." *Brain Res* **1982**, 232 (2): 331.
- Schubert, M.H., Young, K.A., Hicks, P.B. "Galantamine improves cognition in schizophrenic patients stabilized on risperidone." *Biol Psychiatry* **2006**, 60 (6): 530.
- Seeman, P., Lee, T., Chau-Wong, M., Wong, K. "Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors." *Nature* **1976**, 261 (5562): 717.

- Seeman, P., Guan, H.C., Van Tol, H.H. "Dopamine D4 receptors elevated in schizophrenia." *Nature* **1993**, 365 (6445): 441.
- Shono, T., Matsumura, Y., Uchida, K., Tsubata, K., Makino, A. "Efficient Synthesis of Pyrrolizidine and Indolizidine Alkaloids Utilizing Anodically Prepared α Methoxy Carbamates as Key Intermediates." *J. Org. Chem.* **1984**, 49: 300.
- Snyder, S.H. "The dopamine hypothesis of schizophrenia: focus on the dopamine receptor." *Am J Psychiatry* **1976**, 133 (2): 197.
- Stevens, K.E., Fuller, L.L., Rose, G.M. "Dopaminergic and noradrenergic modulation of amphetamine-induced changes in auditory gating." *Brain Res* **1991**, 555 (1): 91.
- Thompson, K.N., Phillips, L.J., Komesaroff, P., et al. "Stress and HPA-axis functioning in young people at ultra high risk for psychosis." *J Psychiatr Res* **2007**, 41 (7): 561.
- Tizabi, Y. "Nicotine and nicotinic system in hypoglutamatergic models of schizophrenia." *Neurotox Res* **2007**, 12 (4): 233.
- Toda, M., Abi-Dargham, A. "Dopamine hypothesis of schizophrenia: making sense of it all." *Curr Psychiatry Rep* **2007**, 9 (4): 329.
- Topiol, S., Sabio, M. "X-ray structure breakthroughs in the GPCR transmembrane region." *Biochem Pharmacol* **2009**, 78 (1): 11.
- Torrice, M.M., Bower, K.S., Lester, H.A., Dougherty, D.A. "Probing the role of the cation- π interaction in the binding sites of GPCRs using unnatural amino acids." *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, 106 (29): 11919.
- Turner, S.W., Toone, B.K., Brett-Jones, J.R. "Computerized tomographic scan changes in early schizophrenia--preliminary findings." *Psychol Med* **1986**, 16 (1): 219.
- Uneri, O., Tural, U., Cakin Memik, N. "[Smoking and schizophrenia: where is the biological connection?]." *Turk Psikiyatri Derg* **2006**, 17 (1): 55.
- van Os, J., Kapur, S. "Schizophrenia." *Lancet* **2009**, 374 (9690): 635.
- van Rossum, J.M. "The significance of dopamine-receptor blockade for the mechanism of action of neuroleptic drugs." *Arch Int Pharmacodyn Ther* **1966**, 160 (2): 492.
- Vasconcelos, S.M., Nascimento, V.S., Nogueira, C.R., Vieira, C.M., Sousa, F.C., Fonteles, M.M., Viana, G.S. "Effects of haloperidol on rat behavior and density of dopaminergic D2-like receptors." *Behav Processes* **2003**, 63 (1): 45.
- Vollenweider, F.X. "Advances and pathophysiological models of hallucinogenic drug actions in humans: a preamble to schizophrenia research." *Pharmacopsychiatry* **1998**, 31 Suppl 2: 92.
- Voß, B., Thienel, R., Leucht, S., Kircher, T. "Therapie kognitiver Defizite durch AChE-Hemmer bei Patienten mit Schizophrenie." *Nervenarzt* **2008**, 79: 47.
- Wadenberg, M.G., Browning, J.L., Young, K.A., Hicks, P.B. "Antagonism at 5-HT(2A) receptors potentiates the effect of haloperidol in a conditioned avoidance response task in rats." *Pharmacol Biochem Behav* **2001**, 68 (3): 363.
- Wadenberg, M.L., Ahlenius, S. "Antipsychotic-like profile of combined treatment with raclopride and 8-OH-DPAT in the rat: enhancement of antipsychotic-like effects without catalepsy." *J Neural Transm Gen Sect* **1991**, 83 (1-2): 43.
- Wadenberg, M.L. "Serotonergic mechanisms in neuroleptic-induced catalepsy in the rat." *Neurosci Biobehav Rev* **1996**, 20 (2): 325.
- Wadenberg, M.L., Hicks, P.B. "The conditioned avoidance response test re-evaluated: is it a sensitive test for the detection of potentially atypical antipsychotics?" *Neurosci Biobehav Rev* **1999**, 23 (6): 851.
- Weinberger, D.R. "Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia." *Arch Gen Psychiatry* **1987**, 44 (7): 660.

- Whalley, H.C., Steele, J.D., Mukherjee, P., Romaniuk, L., McIntosh, A.M., Hall, J., Lawrie, S.M. "Connecting the brain and new drug targets for schizophrenia." *Curr Pharm Des* **2009**, 15 (22): 2615.
- WHO *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision (ICD-10)* **2010**. <http://www.dimi.de/statistic/de/klassi/diagnosen/icd10>.
- Witt, T., Hock, F.J., Lehmann, J. "7-Methyl-6,7,8,9,14,15-hexahydro-5H-benz[d]indolo[2,3-g]azecine: a new heterocyclic system and a new lead compound for dopamine receptor antagonists." *J Med Chem* **2000**, 43 (10): 2079.
- Wittig, T.W. "Dibenz[g,j]-1-oxa-4-azacycloundecene, offenkettige Analoga und verwandte Strukturen als subtypselektive Liganden an humanen klonierten Dopaminrezeptoren - Synthese und Pharmakologie". **2004**, Friedrich-Schiller Universität Jena, Jena.
- Yoshiro, S., Katsumi, H., Shin, M., Yoshinori, H. "Dibenzazecines." JA, S.C.L.O. *Japan* **1976**. US3932384.
- Zhang, A., Liu, Z., Kan, Y. "Receptor Dimerisation - Rationale for the Design of Bivalent Ligands." *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2007a**, 7: 343.
- Zhang, A., Neumeyer, J.L., Baldessarini, R.J. "Recent progress in development of dopamine receptor subtype-selective agents: potential therapeutics for neurological and psychiatric disorders." *Chem Rev* **2007b**, 107 (1): 274.
- Zubin, J., Spring, B. "Vulnerability--a new view of schizophrenia." *J Abnorm Psychol* **1977**, 86 (2): 103.

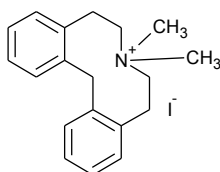
8 Anhang

8.1 Analytische Daten bisher unveröffentlichter Strukturen

Im Folgenden werden die analytischen Daten aller in Kapitel 3 behandelten Verbindungen vorgestellt, die im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert, jedoch nicht veröffentlicht wurden. Analytische Daten zu Verbindungen aus Kapitel 3.1 finden sich desweiteren in **Publikation 1** und **2**, sowie in Veröffentlichungen von *Mohr et al.* (2006) und *Robaa* (2010a). Bivalente Verbindungen aus Kapitel 3.4 und 3.5, die nachfolgend nicht aufgeführt sind, stammen aus **Publikation 4** und Publikationen von *Abadi et al.* (2002) sowie *Mohr et al.* (2005).

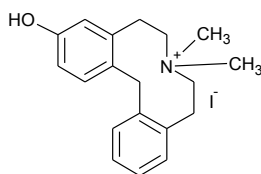
Schmelzpunkte wurden in einer *Gallenkamp*-Apparatur in offenen Kapillaren gemessen und nicht korrigiert. Die ^1H und ^{13}C NMR Daten stammen von einem *Bruker Advance 250* Spektrometer (250 MHz) bzw. *Advance 400* Spektrometer (400 MHz). Elementaranalysen wurden mit einer *Hereus Vario EL* Apparatur bestimmt. Die GC/MS-Spektren wurden mit einer *GCD-Plus* (G 1800C) Apparatur der Firma Hewlett Packard, mit Hilfe eines Elektronen-Ionisationsdetektors aufgenommen.

7,7-Dimethyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo[d,g]azecinium-iodid (Q1)



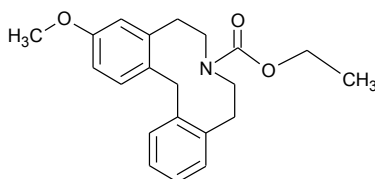
Weißes Pulver, Schmelzpunkt: 263°C, ^1H (DMSO, 250MHz) δ 2,91-2,99 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-Ph); 3,18 (s, 6H, 2 x N-CH₃); 6,63-3,78 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-Ph); 4,26 (s, 2H, Ph-CH₂-Ph); 7,19-7,23 (m, 8H, arom. H). ^{13}C , dept (DMSO, 100MHz) δ 25,91; 36,92; 53,05 (2 x N-CH₃); 62,23; 127,51; 127,83; 131,33; 131,37; 136,91 (quart., arom.); 138,99 (quart., arom.). Elementaranalyse berechnet für C₁₉H₂₄IN x $\frac{2}{5}$ H₂O: C 55,79%; H 6,27%; N 3,25%; gemessen: C 55,97%; H 6,54%; N 3,12%.

3-Hydroxy-7,7-dimethyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo[d,g]azecinium-iodid (Q2)



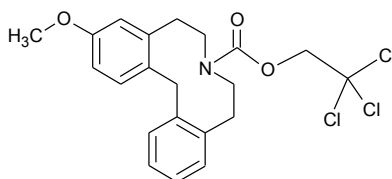
Weißes Pulver, Schmelzpunkt: 262°C, ^1H (DMSO, 400MHz) δ 2,79-2,95 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-Ph); 3,18 (s, 6H, 2 x N-CH₃); 3,61-3,71 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-Ph); 4,13 (s, 2H, Ph-CH₂-Ph); 6,55-6,56 (d, J = 2,5 Hz, 1H, H an C4); 6,60-6,63 (dd, J = 2,5; 8,3 Hz, 1H, H an C2); 7,00-7,02 (d, J = 8,3 Hz, 1H, H an C1); 7,15-7,24 (m, 4H, H an C10, C11, C12, C13). ^{13}C , dept (DMSO, 100MHz) δ 25,89; 26,03; 35,76; 52,59 (2 x N-CH₃); 61,83; 62,54; 114,94; 117,65; 126,85; 127,32; 127,79; 128,93; 131,36; 132,19 (quart., arom.); 136,55 (quart., arom.); 138,08 (quart., arom.); 139,73 (quart., arom.); 156,63 (quart., arom., C3). Elementaranalyse berechnet für C₁₉H₂₄INO x $\frac{2}{5}$ H₂O: C 54,79%; H 6,00%; N 3,36%; gemessen: C 54,56%; H 6,03%; N 3,17%.

Ethyl-3-methoxy-5,8,9,14-tetrahydridibenzo[d,g]azecin-7(6H)-carboxylat (N3)



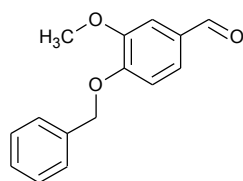
Gelbes Öl; ^1H (Methanol- d_4 , 250 MHz) δ 1,12-1,24 (m, 3H, O-CH₂-CH₃), 3,20-3,53 (m, 8H, N-CH₂-CH₂-Ph); 3,76 (s, 3H, O-CH₃); 4,04-4,12 (m, 2H, Ph-CH₂-Ph); 4,13-4,22 (q, J = 7,0 Hz, 2H, O-CH₂-CH₃); 6,80-6,82 (d, J = 2,7 Hz, 1H, H an C4); 6,82-6,84 (d, J = 2,8 Hz, 1H, H an C2); 7,19-7,41 (m, 5H, H an C1, C10, C11, C12, C13). GC-MS (>98% purity): m/z 339 (18%); 324 (1%); 310 (13%); 294 (2%); 278(1%); 266 (2%); 247 (1%); 234 (32%); 223 (10%); 206 (19%); 191 (3%); 178 (11%); 165 (12%); 152 (2%); 143 (1%); 134 (5%); 116 (10%); 104 (100%); 91 (5%); 77 (2%); 65 (1%). Elementaranalyse berechnet für C₂₁H₂₅NO₃: C 74,31%; H 7,42%; N 4,13%; gemessen: C 74,01%; H 7,39%; N 3,80%.

2,2,2-Trichloroethyl-3-methoxy-5,8,9,14-tetrahydridibenzo[d,g]azecin-7(6H)-carboxylat (N4)



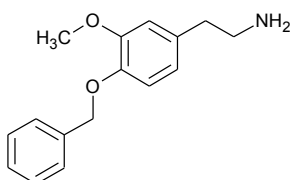
Gelbliches Öl; ^1H (DMSO, 250 MHz) δ 2,62-2,82 (m, 4H N-CH₂-CH₂-Ph); 3,21-3,61 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-Ph); 3,81 (s, 3H, O-CH₃); 4,34-4,54 (m, 2H, Ph-CH₂-Ph); 5,74 (s, 2H, O-CH₂-CCl₃); 6,61-6,82 (m, 2H, H an C2, C4); 7,10-7,34 (m, 5H, H an C1, C10, C11, C12, C13). Elementaranalyse berechnet für C₂₁H₂₂Cl₃NO₃: C 56,97%; H 5,01%; N 3,16%; gemessen: C 57,21%; H 5,27%; N 3,00%.

4-(Benzyloxy)-3-methoxybenzaldehyd (A1)



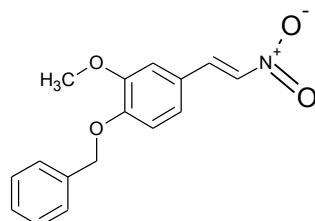
Weiß glitzernde Kristalle, Schmelzpunkt: 59°C. ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) δ 3,93 (s, 3H, O-CH₃); 5,24 (s, 2H, Ph-CH₂-O); 6,97-7,00 (d, J = 8,2 Hz, 1H, H an C2); 7,36-7,43 (m, 7H, H an C5; C6, Ph-CH₂-O); 9,83 (s, 1H, CH₂O). Elementaranalyse berechnet für C₁₅H₁₄O₃: C 74,36%; H 5,82%; gemessen: C 74,59%; H 5,43%.

2-[4-(Benzyloxy)-3-methoxyphenyl]ethylamin (A2)



Weißer Feststoff, Schmelzpunkt: 103°C. ^1H (Methanol- d_4 , 250 MHz) δ 2,75-2,81 (t, J = 7,6 Hz, 2H, Ph-CH₂-CH₂-NH₂); 2,95-3,01 (t, J = 6,7 Hz, 2H, Ph-CH₂-CH₂-NH₂); 3,84 (s, 3H, O-CH₃); 5,06 (s, 2H, Ph-CH₂-O); 6,71-6,75 (dd, J = 2,0; 8,2 Hz, 1H, H an C6); 6,67-6,88 (d, J = 1,9 Hz, 1H, H an C2); 6,90-6,94 (d, J = 8,2 Hz, 1H, H an C5); 7,25-7,37 (m, 5H, Ph-CH₂-O). ^{13}C , dept (Methanol- d_4 , 63 MHz) δ 35,61 (Ph-CH₂-CH₂-NH₂); 41,74 (Ph-CH₂-CH₂-NH₂); 55,16 (O-CH₃); 70,96 (Ph-CH₂-O); 112,79 (C2); 114,80 (C5); 120,67; 127,27; 127,46; 128,02; 131,60 (quart., arom.); 137,38 (quart., arom.); 146,97 (quart., arom.); 150,01 (quart., arom.). Elementaranalyse berechnet für C₁₆H₁₉NO₂: C 74,68%; H 7,44%; N 5,44%; gemessen: C 74,55%; H 7,34%; N 5,43%.

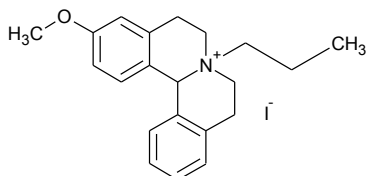
1-(Benzyloxy)-2-methoxy-4-[2-nitroethenyl]benzol (A3)



Gelbe Plättchen, Schmelzpunkt: 118°C. ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) δ 3,93 (s, 3H, O-CH₃); 5,22 (s, 2H, Ph-CH₂-O); 6,91-6,94 (d, J = 8,3 Hz, 1H, H an C5); 7,02-7,03 (d, J = 2,0 Hz, 1H, H an C2); 7,08-7,12 (dd, J = 2,0; 8,3 Hz, 1H, H an C6); 7,26-7,45 (m, 5H, Ph-CH₂-O); 7,49-7,54 (d, J = 9,5 Hz, 1H, Ph-CH=CH-NH₂); 7,91-7,96 (d, J = 9,3 Hz, 1H, Ph-CH=CH-NH₂). ^{13}C , dept (CDCl_3 , 63 MHz) δ

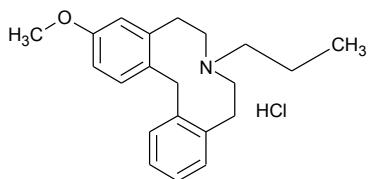
56,10 (O-CH₃); 70,87 (Ph-CH₂-O); 110,85 (C2); 113,48 (C5); 123,09 (quart., arom.); 124,33; 127,22; 128,20; 128,71; 135,25; 136,09 (quart., arom.); 139,27; 150,05 (quart., arom.); 151,94 (quart., arom.). Elementaranalyse berechnet für C₁₆H₁₅NO₄: C 67,36%; H 5,30%; N 4,91%; gemessen: C 66,99%; H 5,20%; N 5,02%.

3-Methoxy-7-propyl-5,8,9,13b-tetrahydro-6H-isochino[1,2-a]isochinolinium-iodid (A4)



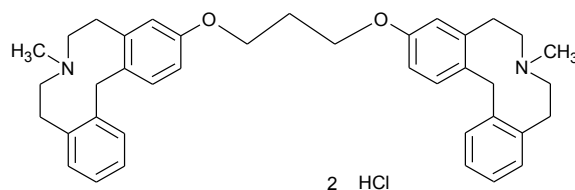
Weißes Pulver, Schmelzpunkt: 201°C. ¹H (Methanol-*d*₄, 250 MHz) δ 0,93-0,99 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, N-CH₂-CH₂-CH₃); 1,94-2,03 (m, 2H, N-CH₂-CH₂-CH₃); 3,23-3,34 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-Ph); 3,39-3,47 (m, 2H, N-CH₂-CH₂-CH₃); 3,70-3,99 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-Ph); 3,81 (s, 3H, O-CH₃); 5,87 (s, 1H, Ph-CH_R-Ph); 6,86-6,90 (dd, *J* = 2,7; 8,6 Hz, 1H, H an C2); 6,94-6,95 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H, H an C4); 7,01-7,04 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H, H an C1); 7,13-7,16 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, H an C13); 7,29-7,45 (m, 3H, H an C10, C11, C12). ¹³C (Methanol-*d*₄, 63 MHz) δ 9,71 (N-CH₂-CH₂-CH₃); 15,65 (N-CH₂-CH₂-CH₃); 23,75; 24,08; 54,10; 54,39; 54,61 (O-CH₃); 62,53; 68,01; 113,16; 113,39; 122,07; 126,96; 128,84; 128,86; 128,97; 130,16; 130,30; 130,47; 132,13; 160,37. Elementaranalyse berechnet für C₂₁H₂₆INO: C 57,66%; H 6,09%; N 3,16%; gemessen: C 57,94%; H 6,02%; N 3,22%.

3-Methoxy-7-propyl-5,6,7,8,9,14-hexahydridibenzo[*d,g*]azecin-hydrochlorid (A5)



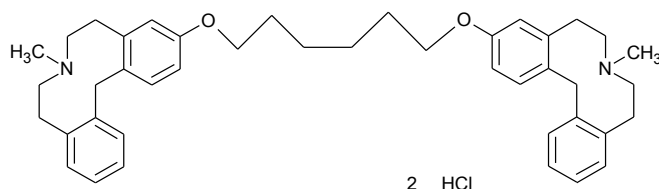
Weißes Pulver, Schmelzpunkt: 309°C. ¹H (Methanol-*d*₄, 250 MHz) δ 0,95-1,01 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, N-CH₂-CH₂-CH₃); 1,76-1,86 (m, 2H, N-CH₂-CH₂-CH₃); 3,07-3,13 (m, 2H, N-CH₂-CH₂-CH₃); 3,20-3,53 (m, 8H); 3,76 (s, 3H, O-CH₃); 4,04-4,12 (m, 1H, Ph-CH₂-Ph); 6,79-6,80 (d, *J* = 2,7 Hz, 1H, H an C4); 6,82-6,83 (d, *J* = 2,7 Hz, 1H, H an C2); 7,19-7,21 (m, 3H, H an C1, C10, C13); 7,37-7,46 (m, 2H, H an C11, C12). ¹³C, dept (Methanol-*d*₄, 63 MHz) δ 9,66 (N-CH₂-CH₂-CH₃); 17,58 (N-CH₂-CH₂-CH₃); 28,25; 28,35; 34,23; 54,33 (O-CH₃); 54,48; 54,81; 59,29; 113,10; 114,90; 126,87; 127,34; 129,64 (quart., arom.); 130,04; 131,29; 131,60; 135,37 (quart., arom.); 136,79 (quart., arom.); 139,83 (quart., arom.); 158,77 (C3). Elementaranalyse berechnet für C₂₁H₂₈ClNO x 7/5 HCl: C 62,39%; H 7,38%; N 3,46%; gemessen: C 62,44%; H 7,22%; N 3,24%.

7-Methyl-3-{3-[(7-methyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo[d,g]azecin-3-yl)oxy]propoxy}-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo[d,g]azecin-dihydrochlorid (B1)



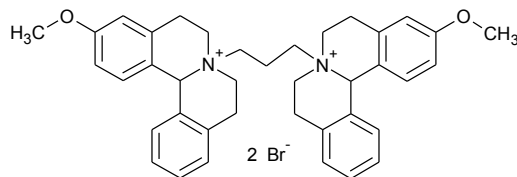
Weißes Pulver, Schmelzpunkt: 198°C. ^1H (Methanol- d_4 , 250 MHz) δ 0,81-0,89 (m, 2H, O-CH $_2$ -CH $_2$); 2,72 (s, 6H, N-CH $_3$); 3,02-3,19 (m, 8H, N-CH $_2$ -CH $_2$); 3,30-3,39 (m, 12H, N-CH $_2$ -CH $_2$; O-CH $_2$ -CH $_2$); 4,11 (s, 4H, Ph-CH $_2$ -Ph); 6,61-6,65 (m, 4H, H an C2, C4); 7,16-7,23 (m, 8H, H an C1, C10, C11, C12); 7,39-7,42 (m, 2H, H an C13). ^{13}C , dept (Methanol- d_4 , 63 MHz) δ 25,25 (O-CH $_2$ -CH $_2$); 30,56; 36,37; 46,14 (N-CH $_3$); 58,86; 59,18; 64,45 (O-CH $_2$ -CH $_2$); 115,55 (C2); 117,59 (C4); 127,96 (quart., arom.); 128,31; 131,88; 132,84; 137,98 (quart., arom.); 139,10 (quart., arom.); 141,75 (quart., arom.); 157,36 (C3). Elementaranalyse berechnet für C $_{39}$ H $_{48}$ Cl $_2$ N $_2$ O $_2$ x H $_2$ O: C 70,36%; H 7,57%; N 4,21%; gemessen: C 70,40%; H 7,23%; N 4,24%.

7-Methyl-3-({6-[(7-methyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo[d,g]azecin-3-yl)oxy]hexyl}oxy)-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo[d,g]azecin-dihydrochlorid (B3)



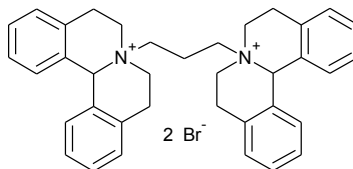
Weißes Pulver, Schmelzpunkt: 251°C. ^1H (Methanol- d_4 , 250 MHz) δ 1,49-1,60 (m, 4H, O-CH $_2$ -CH $_2$ -CH $_2$); 1,71-1,86 (m, 4H, O-CH $_2$ -CH $_2$); 2,26 (s, 6H, N-CH $_3$); 2,62-2,71 (m, 16H, N-CH $_2$ -CH $_2$); 3,90-3,95 (t, J = 6,4 Hz, 4H, O-CH $_2$); 4,36 (s, 4H, Ph-CH $_2$ -Ph); 6,61-6,68 (m, 4H, H an C2, C4); 7,03-7,19 (m, 10H, H an C1, C10, C11, C12, C13). ^{13}C , dept (Methanol- d_4 , 63 MHz) δ 25,91 (O-CH $_2$ -CH $_2$ -CH $_2$); 29,31 (O-CH $_2$ -CH $_2$); 29,68; 34,53; 37,39; 46,61 (N-CH $_3$); 60,40; 60,46; 67,67 (O-CH $_2$ -CH $_2$); 111,81 (C2); 116,69 (C4); 126,10 (quart., arom.); 130,35; 130,64; 131,20; 132,97; 141,02 (quart., arom.); 141,23 (quart., arom.); 142,29 (quart., arom.); 157,38 (C3). Elementaranalyse berechnet für C $_{39}$ H $_{48}$ Cl $_2$ N $_2$ O $_2$ x H $_2$ O: C 70,36%; H 7,57%; N 4,21%; gemessen: C 70,40%; H 7,23%; N 4,24%.

3-Methoxy-7-[3-(3-methoxy-5,8,9,13b-tetrahydro-6*H*-isoquino[1,2-*a*]isoquinolinium-7-yl)propyl]-5,8,9,13b-tetrahydro-6*H*-isoquino[1,2-*a*]isoquinolinium (B4)



Weißes Pulver, Schmelzpunkt: 267°C. ^1H (Methanol- d_4 , 250 MHz) δ 2,71-2,79 (m, 2H, N-CH $_2$ -CH $_2$ -CH $_2$), 3,18-3,32 (m, 8H, N-CH $_2$ -CH $_2$ -Ph); 3,46-3,53 (m, 4H, N-CH $_2$ -CH $_2$ -CH $_2$); 3,78-3,87 (m, 4H, N-CH $_2$ -CH $_2$ -Ph); 3,81 (s, 6H, O-CH $_3$); 4,01-4,03 (m, 4H, N-CH $_2$ -CH $_2$ -Ph); 6,00 (s, 2H, Ph-CH $_2$ -Ph); 6,86-6,91 (m, 4H, H an C2, C4); 7,01-7,04 (m, 2H, H an C1); 7,10-7,19 (m, 2H, H an C13); 7,30-7,41 (m, 6H, H an C10, C11, C12). ^{13}C (Methanol- d_4 , 63 MHz) δ 17,12; 23,75; 24,05; 29,29; 54,57; 54,81; 57,34; 68,11; 113,20; 113,55; 121,70; 127,02; 128,77; 128,91; 130,03; 130,09; 130,19; 130,36; 132,04; 160,47. Elementaranalyse berechnet für $\text{C}_{39}\text{H}_{44}\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_2 \times \frac{5}{2} \text{H}_2\text{O}$: C 60,24%; H 6,35%; N 3,60%; gemessen: C 60,00%; H 6,96%; N 3,35%.

7-[3-(5,8,9,13b-tetrahydro-6*H*-isoquino[1,2-*a*]isoquinolinium-7-yl)propyl]-5,8,9,13b-tetrahydro-6*H*-isoquino[1,2-*a*]isoquinolinium-dibromid (B6)



Weißes Pulver, Schmelzpunkt: 262°C. ^1H (Methanol- d_4 , 250 MHz) δ 2,62-2,78 (m, 2H, N-CH $_2$ -CH $_2$ -CH $_2$), 3,16-3,39 (m, 8H, N-CH $_2$ -CH $_2$ -Ph); 3,49-3,56 (m, 4H, N-CH $_2$ -CH $_2$ -CH $_2$); 3,82-3,39 (m, 4H, N-CH $_2$ -CH $_2$ -Ph); 4,01-4,12 (m, 4H, N-CH $_2$ -CH $_2$ -Ph); 6,10 (s, 2H, Ph-CH $_2$ -Ph); 7,12-7,15 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H, H an C1); 7,28-7,44 (m, 12H, H an C2, C4, C10, C11, C12, C13). ^{13}C , dept (Methanol- d_4 , 63 MHz) δ 17,16; 23,77; 54,88; 57,48; 68,35 (Ph-CH $_2$ -Ph); 127,05; 128,88; 128,96; 129,17; 129,76 (arom. quart.); 130,46 (arom., quart.). Elementaranalyse berechnet für $\text{C}_{37}\text{H}_{40}\text{Br}_2\text{N}_2 \times \frac{5}{2} \text{H}_2\text{O}$: C 63,03%; H 6,70%; N 3,72%; gemessen: C 62,75%; H 6,34%; N 3,70%.

8.2 Abkürzungsverzeichnis

[c,g]-Azecin	Hexahydrodibenzo- bzw. -benzindolo[c,g]azecin
[c,g]-Chinolizin	Tetrahydrodibenzo- bzw. -benzindolo[c,g]chinolizin
[d,g]-Azecin	Hexahydrodibenzo- bzw. -benzindolo[d,g]azecin
[d,g]-Chinolizin	Tetrahydrodibenzo- bzw. -benzindolo[d,g]chinolizin
μM	micromolar
5-HT	Serotonin
AChE	Acetylcholinesterase
Azecinium-	Hexahydrodibenzazecinium-
BChE	Butyrylcholinesterase
Boc	<i>tertiär</i> -Butoxycarbonyl-
BuNH ₂	Butylamin
CAR	Conditioned Avoidance Response
CAT	Katalepsie
CC ₅₀	Konzentration bei halbmaximalem zytotoxischen Effekt
Chinolizinium-	Tetrahydrodibenzochinolizinium-
CHO-Zellen	Zellen aus den Ovarien chinesischer Hamster
CI	Konfidenzintervall
C-L	Cross-leg
D	Dopamin
DC	Dünnschichtchromatographie
DMF	Dimethylformamid
EC ₅₀	Konzentration bei halbmaximaler Wirkung/Rezeptorbindung
ED ₅₀	Dosis bei halbmaximaler Wirkung
EPS	Extrapyramidale Symptome
GABA	γ-Aminobuttersäure
GC-MS	Gaschromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
h	Stunden
HEK-Zellen	Humane embryonale Nierenzellen
M-Rezeptor	Muskarin-Rezeptor
min	Minuten
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
nM	nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMR-	Kernspinresonanz- (nuclear magnetic ressonance)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFC	präfrontaler Cortex
SAR	Struktur-Wirkungs-Beziehungen (Structur-activity relationships)
SEM	Standardfehler (Standard error of the mean)
TEBA	Triethylbenzylammonium-chlorid
THF	Tetrahydrofuran
Troc	Trichloroethyloxycarbonyl
VTA	ventrales tegmentales Areal
ZNS	zentrales Nervensystem

8.3 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1.1.1 Dopaminerge Pfade im menschlichen Gehirn modifiziert nach Crocker (1994)	4
Abbildung 1.1.2 Beispiele einiger Serotonin-Rezeptor-Liganden	5
Abbildung 1.1.3 Selektiver α_7 -Agonist 3-(2,4-Dimethoxybenzyliden)-anabasein	7
Abbildung 1.2.1 Beispiele klassischer Neuroleptika und deren Grundgerüste	8
Abbildung 1.2.2 Beispiele atypischer Neuroleptika	9
Abbildung 1.3.1 Beispiele klinisch relevanter Cholinesterase-Inhibitoren	11
Abbildung 1.4.1 Versuche zur inhibitorischen Wirkung von Neuroleptika auf CAR	12
Abbildung 1.4.2 Apparaturen für das Apomorphin-induzierte Klettern und den Paw-Test	13
Abbildung 1.4.3 Katalepsie-Tests: <i>Bar-Test</i> (links), <i>Cross-Leg-Test</i> (rechts)	15
Abbildung 1.5.1 Leitstrukturentwicklung ausgehend von den Grundstrukturen von Serotonin und Dopamin	16
Abbildung 1.5.2 Leitstrukturen der [d,g]-Azecine	17
Abbildung 1.7.1 Hexahydrodibenzazecine mit verschiedenen Annelierungsmustern	19
Abbildung 1.7.2 Ringerweiterte Derivate der Hexahydrodibenzo[c,g]azecine	20
Abbildung 1.7.3 Derivate mit Substituenten zwischen den Aromaten (R=H, CH ₃ , CH ₂ CH ₃)	20
Abbildung 1.7.4 Hexahydrodibenzazecinium- und Tetrahydrodibenzochinolinium-Derivate (R=H, OH, OCH ₃)	20
Abbildung 3.1.1 Untersuchte Tetrahydrodibenzo[d,g]chinolinium-Salze	34
Abbildung 3.1.2 Tetrahydrodibenzo[c,g]chinolinium-Salze und Ring-erweiterte Homologe	34
Abbildung 3.1.3 Strukturen und D ₁ -Affinitäten von 3-Methoxy-7-methyl-5,8,13,13a-tetrahydro-6H-isochino[3,2-a]isochinoliniumiodid (Q14) und 3-Methoxy-7-methyl-5,6,8,9,14,14a-hexahydroisochino[1,2-b][3]benz-azepiniumiodid (Q15)	35
Abbildung 3.2.1 Letzer Syntheseschritt bei der Darstellung eines Radioliganden aus 3-Methoxy-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo[d,g]azecin	36
Abbildung 3.2.2 Syntheseveruche der <i>NH</i> -Verbindung	36
Abbildung 3.2.3 Syntheseveruch der <i>NH</i> -Verbindung mit Boc als Schutzgruppe	37
Abbildung 3.3.1 Dopamin-Agonisten und das geplante 3-Methoxy-7-methyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo[d,g]azecin-2-ol	38
Abbildung 3.3.2 Synthesestrategie für 3-Methoxy-7-methyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo[d,g]azecin	39
Abbildung 3.3.3 Beispiele einiger Dopamin-Agonisten mit Propylkette am Stickstoff	39
Abbildung 3.3.4 Synthese von 3-Methoxy-7-propyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo[d,g]azecin	39
Abbildung 3.4.1 Mono- und bivalente [d,g]-Azecine (n = 3, 4, 6)	40
Abbildung 3.6.1 Bivalente Substanzen, welche in <i>in vivo</i> -Versuchen getestet wurden	43
Abbildung 3.6.2 Ergebnisse des <i>Open Field</i> -Tests mit Verbindung B8	43
Abbildung 3.6.3 Ergebnisse des <i>Open Field</i> -Tests mit Verbindung B1	44
Abbildung 4.1.1 Im Rahmen dieser Arbeit synthetisierte neue Verbindungen ausgehend von der Leitstruktur LE404	46
Abbildung 4.1.2 Aktive tetrazyklische Dopamin-Rezeptor-Liganden	47
Abbildung 4.1.3 Hexahydrodibenzazecine mit verschiedenen Annelierungsmustern (R= OH, OCH ₃)	47
Abbildung 4.1.4 Nebenprodukte der Synthese von [c,g]-Azecinen	48
Abbildung 4.1.5 Ringerweiterungen an Hexahydrodibenzo[c,g]azecinen und Tetrahydrodibenzochinolizinen	49

Abbildung 4.1.6 Synthetisierte Verbindungen mit Substituenten zwischen den Aromaten	50
Abbildung 4.1.7 Dimere Verbindungen von [<i>d,g</i>]-Azecinen	51
Abbildung 4.1.8 Strukturen neuartiger bivalenter Verbindungen als Cholinesterase-Inhibitoren	52
Abbildung 4.1.9 Strukturelle Ähnlichkeit von Galantamin und monovalenten Strukturen	52
Abbildung 4.1.10 An Dopamin-Rezeptoren untersuchte quartäre Strukturen	54
Abbildung 4.2.1 Strukturen von LE404, LE425, LE300 und LE300ME	55
Abbildung 4.2.2 Abhängigkeit der Zytotoxizität von der Spacer-Länge bei bivalenten Verbindungen	56
Abbildung 4.3.1 Substanzen für <i>in vivo</i> -Versuche	57
Abbildung 4.3.2 Dosis-Wirkungs-Kurven der Katalepsie-Tests	61
 Tabelle 3.1.1 Azecinium-Salze und ihre Affinitäten zu humanen geklonten Dopamin-Rezeptoren	34
Tabelle 3.4.1 Ergebnisse der Radioligandbindungsstudien und des Zytotoxizitätsassays	41
Tabelle 3.5.1 Inhibitorische Aktivitäten an AChE und BChE sowie die BChE-Selektivität	42
Tabelle 4.2.1 Ergebnisse der Zytotoxizitätstests	56
Tabelle 4.3.1 Radioligandbindungsdaten der <i>in vivo</i> getesteten Verbindungen	58
Tabelle 4.3.2 Ergebnisse des Stabsprung-Tests	59
Tabelle 4.3.3 Ergebnisse des <i>Open Field</i> -Versuches zur lokomotorischen Aktivität	60
Tabelle 4.3.4 Ergebnisse der Katalepsie-Versuche 30 Minuten nach Substanzgabe und die therapeutische Breite hinsichtlich des Auftretens einer Katalepsie (CAT/CAR)	62
Tabelle 4.3.5 Affinitäten von LE300 und LE404 zu einigen Serotonin-Rezeptor-Subtypen	63

8.4 Curriculum vitae

PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

Name:	Maria Schulze
Familienstand:	ledig
Geburtsdatum,-ort:	12.07.1982, Leipzig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

AUSBILDUNG

1993-1997	Lichtenberg-Gymnasium, Leipzig
1997-2001	Wilhelm-Ostwald-Gymnasium, Leipzig
2001	Abitur
2001-2005	Pharmaziestudium, Universität Leipzig,
2005-2006	Dritter Abschnitt der pharmazeutischen Ausbildung <ul style="list-style-type: none"> • Petersbogen-Apotheke, Leipzig (6 Monate) • Arzneimittelwerk Gödecke, Pfizer GmbH, Freiburg (6 Monate) Bereich: Qualitätssicherung
2006	Approbation
Seit 2007	Promotion am Lehrstuhl für pharmazeutisch-medizinische Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Betreuer: Prof. Dr. Jochen Lehmann, Prof. Dr. Christian Fleck Thema: „Design, Synthese und Pharmakologie neuer Dopamin-/Serotonin-Antagonisten und Cholinesterase-Inhibitoren – Strukturoptimierung und <i>in vivo</i> -Experimente“

WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT

1998-2000	wissenschaftlich praktische Arbeit in metallorganischer Chemie, Universität Leipzig, Betreuer: Dr. Ch. Drost, Prof. Dr. Hey-Hawkins Thema: „Synthese und Charakterisierung von zweiwertigen Verbindungen der Elemente der IV. Hauptgruppe“
2002	Nebentätigkeit bei IBFB-Pharma, Leipzig
2003	Auslandpraktikum an der University of Bath, England, im Bereich pharmazeutische Chemie, Betreuer: Dr. Mike Threadgill, Dr. Steve Black Thema: „Synthese von Carboranen für die <i>Boron-Neutron-Capture-Therapy</i> “
2003-2005	wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pharmazie, Universität Leipzig
Seit 2007	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazie, Friedrich-Schiller-Universität Jena

8.5 Publikationsverzeichnis

8.5.1 Wissenschaftliche Beiträge in Fachzeitschriften

Closo → Nido Cage Degradation of 1-(Substituted-phenyl)-1,2-dicarbadoodecaborane(12)s in wet DMSO under Neutral Conditions

C. Linda Powell, Maria Schulze, Steven J. Black, Andrew S. Thompson und Michael D. Threadgill
Tetrahedron Lett **2007**, 48 (7): S. 1.251-1.254

Dibenzazecine Scaffold Rebuilding – Is the Flexibility always Essential for High Affinities at Dopamine Receptors?

Maria Schulze, Franziska K. U. Müller, Jennifer M. Mason, Helmar Görls, Jochen Lehmann und Christoph Enzensperger
Bioorg Med Chem **2009**, 17 (19): S. 6.898-6.907

Ring Expansions of Tetrahydroprotoberberines and Related Dibenzo[*c,g*]azecines Modulate the Dopamine Receptor Subtype Affinity and Selectivity

Maria Schulze, Oliver Siol, Werner Meise, Jochen Lehmann und Christoph Enzensperger
Arch Pharm (Weinheim) **2010**, 343(4): S. 207-214

Bivalent 5,8,9,13b-Tetrahydro-6H-isoquino[1,2-*a*]isoquinolines and –isoquinolinium Salts: Novel Heterocyclic Templates for Butyrylcholinesterase Inhibitors

Maria Schulze, Oliver Siol, Michael Decker and Jochen Lehmann
Bioorg Med Chem Lett **2010**, 20(9): S. 2.946-2.949

Molecular Combination of the Dopamine and Serotonin Scaffolds Yield in Novel Antipsychotic Drug Candidates – Characterization by *in vivo* Experiments

Maria Schulze, Oliver Siol, Dina Robaa, Franziska K. U. Müller, Christian Fleck and Jochen Lehmann
J Med Chem, eingereicht April 2010

Exploring the Space Between the Two Pharmacophores: SAR-Studies at Dopamine-Receptors on Dibenz- and Benzindoloazecines with Small Substituents Between the Aromatic Moieties

Maria Schulze, Christoph Enzensperger, Dina Robaa and Jochen Lehmann
Bioorg Med Chem Lett, Manuskript in Vorbereitung

8.5.2 Poster

Scaffold modifications of dibenzazecines – Increase of flexibility does not always enhance the affinities for dopamine receptors

Maria Schulze, Franziska Müller, Christoph Enzensperger, Jochen Lehmann

Summer School Medicinal Chemistry, Regensburg 2008

Cytotoxicity structure relationships at bivalent ligands

Maria Schulze, Jochen Lehmann, Thomas Winkler, Oliver Siol

DPHG Jahrestagung, Jena 2009

Novel potential D₁/D₅/5-HT₂-selective antipsychotics – from design and synthesis via *in vitro* to *in vivo*

Maria Schulze, Franziska K.U. Müller, Dina Robaa, Christoph Enzensperger, Christian Fleck, Jochen Lehmann

2nd International Conference on Drug Discovery & Therapy Dubai Men's College, Dubai 2010

8.5.3 Vorträge

Improving influence of bivalence on cholinesterase inhibitor activity of tetrahydrodibenzo-quinolizines

Maria Schulze and Jochen Lehmann

DPHG Jahrestagung, Bonn 2008

A scaffold-rebuilding approach on [d,g]-azecines: Contribution of the ring opening to their high affinity on dopamine receptors

Christoph Enzensperger, Maria Schulze, Werner Meise, Jochen Lehmann

DPHG Jahrestagung, Bonn 2008

Novel potential antipsychotics – from design via synthesis and *in vitro* to *in vivo*

Maria Schulze, Jochen Lehmann and Christian Fleck

Internationale Doktorandentagung DPhG, Pichlarn 2009

***In vivo* investigations on azecines as potential neuroleptics – Is it possible to combine the advantages of dopamine and serotonin antagonists in one molecule?**

Maria Schulze, Jochen Lehmann and Christian Fleck

DGPT Jahrestagung, Mainz 2010

8.6 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich,

dass mir die geltende Promotionsordnung der Fakultät bekannt ist.

Die vorliegende Arbeit habe ich selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt.

Alle Personen, die an dem Inhalt der in dieser Arbeit enthaltenen Manuskripte mitgewirkt haben, sind entweder als Autoren aufgeführt oder in der Danksagung der jeweiligen Publikation erwähnt.

Ich habe weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen, noch unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen im Zusammenhang mit dem Inhalt meiner Dissertation an Dritte erbracht.

Die vorliegende Dissertation habe ich ausschließlich an der Friedrich-Schiller-Universität Jena als Prüfungsarbeit eingereicht.

Jena, den 14. April 2010

8.7 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum zwischen April 2007 bis April 2010 am Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität Jena durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Jochen Lehmann für die stets freundliche und konstruktive wissenschaftliche Unterstützung und das sehr entspannte Arbeitsklima, sowie die Möglichkeit auf diesem sehr interessanten Arbeitsgebiet auf so vielfältige Weise forschen zu dürfen. Durch sein angenehmes Wesen sind auch Arbeitsgruppentreffen bis spät in die Nacht immer eine willkommene Abwechslung gewesen.

Gleichermaßen möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Fleck für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Betreuung bei den Tierexperimenten und die motivierende Arbeitsatmosphäre bedanken. Zudem danke ich ihm für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Insbesondere Herrn Dr. Christoph Enzensperger danke ich für sein offenes Ohr und Hilfestellungen bei allen wissenschaftlichen und sonstigen Fragestellungen. Die anregenden Diskussionen und die effektive Zusammenarbeit haben die Promotionszeit sehr bereichert.

Herrn Professor Dr. Elz danke ich für die freundliche Übernahme des Gutachtens.

Frau Professor Dr. Gisela Grecksch möchte ich herzlich für die Einführung in die in dieser Arbeit beschriebenen Tierversuche, sowie die ständige Kooperationsbereitschaft bezüglich der Konstruktion der Stabsprung-Apparatur danken.

Allen Kooperationspartnern danke ich für die unkomplizierte Zusammenarbeit und konstruktiven Anregungen.

Für das offene und angenehme Arbeitsklima möchte ich mich bei allen Kollegen des pharmazeutisch-chemischen Instituts bedanken, insbesondere bei den technischen Angestellten für die tatkräftige Unterstützung bei den pharmakologischen Testungen. Zudem gilt ein großer Dank PD Dr. Andreas Seeling für das Korrekturlesen der Arbeit und die vielen fachlichen Ratschläge.

Bei den Mitarbeitern des pharmakologisch-toxikologischen Instituts möchte ich mich für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und zudem für die hilfreichen Ratschläge insbesondere bei Frau PD Dr. Amelie Lupp und Anne Imhof bedanken. Für die freundliche Einführung in die Arbeit mit Tieren danke ich Anne Berthold.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und Freunden danken für die vielen Aufmunterungen, wenn es mal nicht so lief, für das Korrekturlesen der Arbeit und für alle so wichtigen privaten Zerstreuungen sowie insbesondere Dr. Oliver Siol für die geduldige und oft konstruktive Beschäftigung mit meiner Arbeit und die schöne Zeit.